



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0109131-0 B1



(22) Data do Depósito: 16/02/2001

(45) Data de Concessão: 25/08/2020

(54) Título: DNA, VETOR DE EXPRESSÃO COMPREENDENDO O MESMO, FATOR VIII MODIFICADO DE PORCINO, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA COMPREENDENDO O MESMO

(51) Int.Cl.: C12N 15/12; C07K 14/755; A61K 38/37; C12N 15/85.

(30) Prioridade Unionista: 10/03/2000 US 09/523,656.

(73) Titular(es): BAXALTA GMBH; BAXALTA INCORPORATED.

(72) Inventor(es): JOHN S. LOLLAR.

(86) Pedido PCT: PCT US2001005076 de 16/02/2001

(87) Publicação PCT: WO 2001/068109 de 20/09/2001

(85) Data do Início da Fase Nacional: 10/09/2002

(57) Resumo: "FATOR VIII MODIFICADO". A invenção refere-se a uma forma modificada sem domínio B de fator VIII porcino, a um DNA que codifica a mesma e ao uso da mesma para o tratamento de hemofilia.

11/2

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "DNA, VETOR DE EXPRESSÃO COMPREENDENDO O MESMO, FATOR VIII MODIFICADO DE PORCINO, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO TERA-PÊUTICA COMPREENDENDO O MESMO".

5 Referência Cruzada a Pedidos de Patente Relacionados

Este pedido de patente reivindica a prioridade do Pedido de Patente U.S. Nº 09 / 037.601 depositado em 10 de março de 1998; que é uma continuação em parte do Pedido de Patente U.S. Nº 08 / 670.707 depositado em 26 de junho de 1996, que concedida em como Patente U.S. Nº 5.859.204 e do Pedido de Patente Internacional Nº PCT / US 97 / 11155 depositado em 26 de junho de 1997.

Reconhecimento do Suporte Federal para Pesquisa

O governo tem direitos nesta invenção provenientes de National Institutes of Health Grant No. HL46215 que financiou parcialmente a pesquisa que conduz a esta invenção.

Fundamentos da Invenção

A coagulação do sangue começa quando plaquetas aderem à parede cortada de um vaso sangüíneo danificado em um sítio de lesão. Subseqüentemente, em uma cascata de reações reguladas enzimaticamente, as moléculas solúveis de fibrinogênio são convertidas pela enzima trombina a fios insolúveis de fibrina que mantêm as plaquetas juntas em um trombo. Em cada etapa na cascata, um precursor de proteína é convertido a uma protease que cliva o próximo precursor de proteína na série. São necessários cofatores na maior parte das etapas.

O Fator VIII circula como um precursor inativo no sangue, fortemente ligado e não-covalentemente ao fator de von Willebrand. O Fator VIII é ativado proteoliticamente por trombina ou por fator Xa, que dissocia o mesmo do fator de von Willebrand e ativa a sua função pró-coagulante na cascata. Em sua forma ativa, o fator de proteína VIIIa é um co-fator que aumenta a eficiência catalítica do fator IXa em direção à ativação do fator X por diversas ordens de grandeza.

As pessoas com deficiências no fator VIII ou anticorpos contra o fator VIII que não forem tratadas com fator VIII sofrem de hemorragia interna descontrolada que pode causar uma série de sintomas graves, desde reações



inflamatórias nas juntas até morte precoce. Hemofílicos graves, que chegam em torno de 10.000 nos Estados Unidos, podem ser tratados com infusão de fator VIII humano, que irá restaurar a capacidade normal de coagulação do sangue se administrado com freqüência e concentração suficientes. A definição clássica de fator VIII, de fato, é aquela substância presente no plasma normal do sangue que corrige o defeito da coagulação em plasma derivados de indivíduos com hemofilia A.

O desenvolvimento de anticorpos ("inibidores" ou "anticorpos inibidores") que inibem a atividade do fator VIII é uma séria complicação no tratamento de pacientes com hemofilia. Os auto-anticorpos se desenvolvem em aproximadamente 20% dos pacientes com hemofilia A em resposta às infusões terapêuticas do fator VIII. Em pacientes não-tratados anteriormente com hemofilia A que desenvolvem inibidores, o inibidor habitualmente se desenvolve dentro de um ano de tratamento. Adicionalmente, os anticorpos que inativam o fator VIII se desenvolvem ocasionalmente em indivíduos com níveis de fator VIII previamente normais. Se o título de inibidor for suficientemente baixo, os pacientes podem ser tratados pelo aumento da dose de fator VIII. No entanto, freqüentemente o título de inibidor é tão alto que ele não pode ser sobrepujado pelo fator VIII. Uma estratégia alternativa é desviar a necessidade pelo fator VIII durante hemostase normal usando-se preparações de complexo de fator IX (por exemplo, KONYNE ®, Proplex ®) ou fator VIII humano recombinante. Adicionalmente, como o fator VIII porcino habitualmente tem substancialmente menos reatividade com os inibidores do que o fator VIII humano, tem sido usada uma preparação de fator VIII porcino parcialmente purificada (HYATE:C ®). Muitos pacientes que desenvolveram anticorpos inibidores ao fator VIII humano foram tratados com sucesso com o fator VIII porcino e toleraram tal tratamento durante longos períodos de tempo. No entanto, a administração do fator VIII porcino não é uma solução completa porque os inibidores podem ser desenvolver a fator VIII porcino após uma ou mais infusões em alguns pacientes.

Diversas preparações de fator VIII derivado de plasma humano de graus de pureza variáveis são comercialmente disponíveis para o trata-

mento da hemofilia A. Estas incluem um fator VIII parcialmente purificado derivado do sangue reunido de muitos doadores que é tratado a quente e com detergente contra vírus porém contêm um nível significativo de proteínas antigênicas; um fator VIII purificado por anticorpo monoclonal que tem

5 níveis mais baixos de impurezas antigênicas e contaminação viral; e fator VIII humano recombinante, para os quais estão em andamento algumas experiências clínicas. Infelizmente, o fator VIII humano é instável a concentrações e pH fisiológicos, está presente no sangue a uma concentração extremamente baixa (0,2 µg / ml de plasma) e tem baixa atividade específica de coagulação. Preocupações de saúde pública referentes ao risco de vírus ou de

10 outros contaminantes contidos no sangue limitaram a utilidade do fator VIII porcino purificado partindo de sangue porcino.

Os sujeitos hemofílicos requerem reposição diária de fator VIII para evitar hemorragia e a artropatia hemofílica deformante resultante. No

15 entanto, os suprimentos têm sido inadequados e ocorrem problemas em uso terapêutico devido à dificuldade de isolamento e de purificação, imunogenicidade e a necessidade de remoção do risco de AIDS e de infectividade por hepatite. O uso de fator VIII humano recombinante ou do fator VIII porcino parcialmente purificado não irá resolver todos os problemas.

Os problemas associados com o fator VIII derivados de plasma comumente usado, comercialmente disponível, estimularam interesse significativo no desenvolvimento de um melhor produto de fator VIII. Há uma necessidade de uma molécula mais potente de fator VIII de modo que possam

20 ser liberadas mais unidades de atividade de coagulação por molécula; uma molécula de fator VIII que seja estável a um pH e a uma concentração fisiológicos selecionados; uma molécula de fator VIII que é menos apta a causar a produção de anticorpos inibidores; e uma molécula de fator VIII que evite detecção imunológica em pacientes que já adquiriram anticorpos ao fator VIII humano.

25

É portanto um objetivo da presente invenção fornecer um fator VIII que corrija hemofilia em um paciente deficiente em fator VIII ou que tenha inibidores ao fator VIII humano.

30

É um outro objetivo da presente invenção fornecer métodos para o tratamento de sujeitos hemofílicos.

É ainda um outro objetivo da presente invenção fornecer um fator VIII que seja estável a um pH e a uma concentração fisiológica selecionados.

É também ainda um outro objetivo da presente invenção fornecer um fator VIII que tenha maior atividade coagulante do que o fator VIII humano.

É um objetivo adicional da presente invenção fornecer um fator VIII contra o qual seja produzido menos anticorpo.

É um outro objetivo da presente invenção fornecer um método para se obter fator VIII porcino recombinante e fator VIII porcino especificamente modificado.

Sumário da Invenção

A determinação da inteira seqüência de DNA que codifica o fator VIII porcino aqui apresentada permitiu, pela primeira vez, a síntese de fator VIII porcino de comprimento total por expressão do DNA que codifica o fator VIII porcino em uma célula hospedeira adequada. O fator VIII porcino recombinante purificado é portanto um aspecto da presente invenção. O DNA que codifica cada domínio de fator VIII porcino assim como qualquer fragmento especificado do mesmo, pode ser expresso similarmente. Além disso, o fVIII porcino que tenha todo ou parte do domínio B deletado (fVIII porcino sem domínio B) é tomado disponível como parte da presente invenção, por expressão de DNA que codifica fVIII porcino que tem uma deleção de um ou mais códons do domínio B.

Também são fornecidos composições farmacêuticas e métodos para tratamento de pacientes que tenham deficiência de fator VIII que compreende a administração de fator VIII porcino recombinante ou de um fator VIII porcino recombinante modificado, em particular um fator VIII porcino sem domínio B.

Breve Descrição das Ilustrações

As Figuras. 1A-1H consideradas juntas fornecem uma compara-

ção de seqüência alinhada das seqüências ácidas de fator VIII humano, de porco e de camundongo.

Descrição Detalhada da Invenção

5 A não ser se for especificado ou indicado de outra maneira, como usado neste caso, o "fator VIII" representa qualquer molécula de proteína funcional de fator VIII proveniente de qualquer mamífero.

10 Como usado neste caso, o "fator VIII de mamífero" inclui o fator VIII com seqüência de aminoácido derivada de qualquer mamífero não-humano, a não ser se for especificado de outra maneira. "Animal", como usado neste caso, refere-se a porco e a outros mamíferos não-humanos.

15 Uma "proteína de fusão" ou "fator VIII de fusão ou fragmento do mesmo", como usado neste caso, é o produto de um gene híbrido em que é alterada a seqüência de codificação, por exemplo, por associação de parte da mesma à seqüência de codificação para uma segunda proteína proveniente de um gene diferente em registro apropriado de quadro de leitura tal que possam ocorrer transcrição não-interrompida e tradução dos segmentos associados para produzir um gene híbrido que codifica a proteína de fusão.

20 Um ácido nucléico ou um aminoácido "correspondente" ou seqüência de um deles, como usado neste caso, é um presente em um sítio em uma molécula de fator VIII ou fragmento do mesmo que tenha a mesma estrutura e/ou função como um sítio na molécula de fator VIII de uma outra espécie, embora o número de ácido nucléico ou de aminoácido possa não ser idêntico. Uma seqüência de DNA "correspondente a" uma outra seqüência de fator VIII corresponde substancialmente a tal seqüência e hibridiza à seqüência da SEQ ID N° designada sob condições restritivas. Uma seqüência de DNA "correspondente a" uma outra seqüência de fator VIII também inclui uma seqüência que resulta na expressão de um fator VIII ou de um fragmento do mesmo e hibridizaria à SEQ ID N° designada porém para a redundância do código genético.

30 Um resíduo ou uma seqüência de aminoácido "único", como usado neste caso, refere-se a uma seqüência ou a um resíduo de aminoácido na molécula de fator VIII de uma espécie que é diferente do resíduo ou

da seqüência homóloga na molécula de fator VIII de uma outra espécie.

"Atividade específica," como usada neste caso, refere-se à atividade que irá corrigir o defeito de coagulação do plasma deficiente em fator VIII humano. A atividade específica é medida em unidades de atividade de coagulação por miligrama de proteína de fator VIII total em um ensaio padronizado em que o tempo de coagulação do plasma deficiente em fator VIII humano é comparado ao do plasma humano normal. Uma unidade de atividade de fator VIII é a atividade presente em um mililitro de plasma humano normal. No ensaio, quanto mais curto o tempo para a formação de coágulo, maior a atividade do fator VIII que está sendo dosado. O fator VIII porcino tem atividade de coagulação em um ensaio de fator VIII humano.

"Expressão" refere-se ao conjunto de processos que ocorrem em que é utilizada informação genética para fornecer um produto. Um DNA que codifica a seqüência de aminoácido de fator VIII porcino pode ser "expresso" dentro de uma célula hospedeira de mamíferos para fornecer a proteína de fator VIII porcino. Os materiais, as estruturas genéticas, as células hospedeiras e as condições que permitem que ocorra a expressão de uma dada seqüência de DNA são bem conhecidos na técnica e podem ser manipulados para afetar o tempo e a quantidade de expressão, assim como a localização intra- ou extra-celular da proteína expressada. Por exemplo, por inclusão de DNA que codifica um peptídeo sinal na extremidade 5' do DNA que codifica o fator VIII porcino (a extremidade 5' sendo, por convenção, aquela extremidade que codifica o terminal NH₂ da proteína) a proteína expressada se torna exportada do interior da célula hospedeira para dentro do meio de cultura. O fato de fornecer o DNA que codifica um peptídeo sinal em combinação com o DNA que codifica o fator VIII porcino é vantajoso porque o fator VIII expressado é exportado para dentro do meio de cultura o que simplifica o processo de purificação. Um peptídeo sinal preferido é um peptídeo sinal de fator VIII de mamífero.

O nucleotídeo de cDNA de fator VIII humano e as seqüências de aminoácido previstas são apresentadas nas SEQ ID N^{os} 1 e 2, respectivamente. O fator VIII é sintetizado como uma proteína de cadeia simples com

aproximadamente 300 kDa com homologia interna de seqüência que define a seqüência de "domínio" NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH. Em uma molécula de fator VIII, um "domínio", como usado neste caso, é uma seqüência contínua de aminoácidos que é definida por identidade de seqüência interna de aminoácido e sítios de clivagem proteolítica por trombina. A não ser se for especificado de outra maneira, os domínios do fator VIII incluem os resíduos de aminoácido a seguir, quando as seqüências estiverem alinhadas com a seqüência de aminoácido humana (SEQ ID N° 2): A1, resíduos Ala1-Arg372; A2, resíduos Ser373-Arg740; B, resíduos Ser741-Arg1648; A3, resíduos Ser1690-Ile2032; C1, resíduos Arg2033-Asn2172; C2, resíduos Ser2173-Tyr2332. A seqüência A3-C1-C2 inclui resíduos Ser1690-Tyr2332. O segmento restante, resíduos Glu1649-Arg1689, é habitualmente citado como o peptídeo de ativação de cadeia leve do fator VIII. O fator VIII é proteoliticamente ativado por trombina ou por fator Xa, que dissocia o mesmo do fator de von Willebrand, formando o fator VIIIa, que tem função pró-coagulante. A função biológica do fator VIIIa é aumentar a eficiência catalítica do fator IXa em direção à ativação do fator X por diversas ordens de grandeza. O fator VIIIa ativado por trombina é um heterotrímero A1/A2/A3-C1-C2 de 160 kDa que forma um complexo com o fator IXa e com o fator X sobre a superfície de plaquetas ou de monócitos. Um "domínio parcial" como usado neste caso é uma seqüência contínua de aminoácidos que faz parte de um domínio.

"Subunidades" de fator VIII humano ou animal, como usado neste caso, são as cadeias pesadas e leves da proteína. A cadeia pesada do fator VIII contém três domínios, A1, A2 e B. A cadeia leve do fator VIII também contém três domínios, A3, C1 e C2.

Os termos "epítipo," "sítio antigênico" e "determinante antigênico," como usado neste caso, são usados sinonimamente e são definidos como uma porção do fator VIII humano ou animal ou fragmento do mesmo que é especificamente reconhecido por um anticorpo. Ele pode consistir em qualquer número de resíduos de aminoácido e pode ser dependente da estrutura primária, secundária ou terciária da proteína.

O termo "sítio imunogênico," como usado neste caso, é definido

como uma região do fator VIII humano ou animal, ou fragmento do mesmo, que provoca especificamente a produção de anticorpo ao fator VIII ou fragmento em um ser humano ou em um animal, como medido por protocolos de rotina, tal como imunoensaio, por exemplo ELISA ou o ensaio de Bethesda, aqui descrito. Ele pode consistir em qualquer número de resíduos de aminoácido e pode ser dependente da estrutura primária, secundária ou terciária da proteína. Em algumas modalidades, o fator VIII híbrido ou equivalente híbrido ou fragmento dos mesmos é não-imunogênico em um animal ou em um ser humano do que o fator VIII humano ou porcino.

10 "Deficiência de fator VIII," como usado neste caso, inclui a deficiência na atividade de coagulação causada pela produção de fator VIII defeituoso, por produção inadequada ou nenhuma produção de fator VIII ou por inibição parcial ou total de fator VIII por inibidores. A hemofilia A é um tipo de deficiência de fator VIII resultante de um defeito em um gene ligado-X e da ausência de deficiência da proteína de fator VIII que ele codifica.

15 Como usado neste caso, "ensaios diagnósticos" incluem ensaios que de alguma maneira utilizam a interação antígeno - anticorpo para detectar e/ou avaliar quantitativamente a quantidade de um anticorpo em particular que está presente em uma amostra para teste para auxiliar na seleção de terapias médicas. Há muitos tais ensaios conhecidos dos versados na técnica. Como usado neste caso, DNA de fator VIII humano, porcino ou porcino modificado ou fragmento do mesmo e proteína expressa partindo do mesmo, em todo ou em parte, pode ser usado em lugar dos reagentes correspondentes nos ensaios conhecidos de outra forma, sendo que os ensaios modificados podem ser usados para detectar e/ou avaliar quantitativamente os anticorpos ao fator VIII. É o uso destes reagentes, o DNA de fator VIII ou fragmento do mesmo ou proteína expressa partindo do mesmo, que permite a modificação de ensaios conhecidos para detecção de anticorpos a fator VIII humano ou animal. Tais ensaios incluem, porém não são limitados a ELISAs, ensaios de imunodifusão e imunoblots. Os métodos adequados para realizar qualquer um destes ensaios são conhecidos dos versados na técnica. Como usado neste caso, o fator VIII ou fragmento do mesmos que

inclui pelo menos um epítopo da proteína pode ser usado como o reagente diagnóstico. Exemplos de outros ensaios em que pode ser usado o fator VIII humano, porcino ou porcino modificado ou fragmento do mesmo incluem o ensaio de Bethesda e ensaios de anticoagulação.

5 O termo "DNA que codifica uma proteína, tal como fator VIII porcino" significa um ácido polidesoxinucleico cuja seqüência de nucleotídeo incorpora a informação de codificação a uma célula hospedeira para a seqüência de aminoácido da proteína, por exemplo fator VIII porcino, de acordo com as relações conhecidas do código genético.

10 O "produto de expressão" de um DNA que codifica um fator VIII humano ou animal ou um fator VIII modificado é o produto obtido pela expressão do DNA referenciado em uma célula hospedeira adequada, inclusive tais características de modificação pré- ou pós-translacional de proteína codificada pelo DNA referenciado, que inclui mas não é limitada à glicosilação, clivagem proteolítica e similares. É sabido na técnica que tais modificações podem ocorrer e podem diferir um pouco dependendo do tipo da célula hospedeira e de outros fatores e pode resultar em isoformas moleculares do produto, com retenção da atividade pró-coagulante. Ver, por exemplo Lind, P. e outros, *Eur. J. Biochem.* **232**: 1927 (1995), aqui incorporada como referência.

20 Um "vetor de expressão" é um elemento de DNA, freqüentemente de estrutura circular, que tem a capacidade de se replicar autonomamente em uma célula hospedeira desejada ou de se integrar a um genoma de célula hospedeira e também possuir certas características bem conhecidas que permitem a expressão de um DNA codificante inserido na seqüência de vetor no sítio apropriado em uma orientação apropriada. Tais características podem incluir, porém não estão limitadas a, uma ou mais seqüências promotoras para dirigir o início da transcrição do DNA codificante e de outros elementos de DNA tais como intensificadores, sítios de poliadenilação e similares, como é bem conhecido na técnica. O termo "vetor de expressão" é usado para representar tanto um vetor que tenha uma seqüência de codificação de DNA a ser expressa inserida dentro de sua seqüência como um

vetor que tenha os necessários elementos de controle de expressão assim dispostos em relação a um sítio de introdução que possa servir para expressar qualquer DNA codificante inserido no sítio, assim como bem conhecido na técnica. Desse modo, por exemplo, um vetor em que há falta de promotor
5 pode se tornar um vetor de expressão pela inserção de um promotor combinado com um DNA codificante;

Descrição Geral e Métodos

A Patente U.S. 5.364.771 descreveu a descoberta de moléculas híbridas de fator VIII humano / porcino que têm atividade coagulante, em que
10 elementos da molécula de fator VIII de ser humano ou de porco são usados em lugar dos elementos correspondentes da molécula de fator VIII das outras espécies. A Patente U.S. 5.663.060 descreve as moléculas de fator VIII pró-coagulante híbridas de ser humano / animal e equivalentes híbridas, em que os elementos da molécula de fator VIII de uma espécie são usados em
15 lugar dos elementos correspondentes da molécula de fator VIII das outras espécies.

Como a informação corrente indica que o domínio B não tem epítipo inibidor e não apresenta efeito conhecido sobre a função do fator VIII, em algumas modalidades o domínio B é totalmente ou parcialmente
20 deletado nas moléculas de fator VIII híbridas ativas ou equivalentes híbridas ou fragmentos das mesmas ("B(-) fator VIII") preparadas por qualquer um dos métodos aqui descritos.

O gene do fator VIII humano foi isolado e expresso em células de mamíferos, como relatado por Toole, J.J. e outros (1984) *Nature* 312:
25 342-347 (Genetics Institute); Gitschier, J. e outros (1984) *Nature* 312: 326-330 (Genentech); Wood, W.I. e outros (1984) *Nature* 312: 330-337 (Genentech); Vehar, G.A. e outros (1984) *Nature* 312: 337-342 (Genentech); WO 87 / 04187; WO 88 / 08035; WO 88 / 03558; Patente U.S. Nº 4.757.006 e a sequência de aminoácido foi deduzida de cDNA. A Patente U.S. Nº 4.965.199
30 de Capon e outros divulga um método de DNA recombinante para produzir o fator VIII em células hospedeiras de mamíferos e purificação de fator VIII humano. Foi relatada a expressão de fator VIII humano sobre células de

CHO (ovário de hamster chinesa) e BHKC (células de rim de bebê hamster). O fator VIII humano foi modificado para deletar parte ou todo o domínio B (Patente U.S. Nº 4.868.112) e foi tentada a substituição do domínio do fator VIII humano pelo domínio B do fator V humano (Patente U.S. Nº 5.004.803).

5 A seqüência de cDNA que codifica o fator VIII humano e a seqüência de aminoácido prevista são apresentadas nas SEQ ID Nºs 1 e 2, respectivamente. Na SEQ ID Nº 1, a região de codificação começa na posição de nucleotídeo 208, o triplete GCC sendo o códon para o número de aminoácido 1 (Ala) da proteína madura como fornecida na SEQ ID Nº 2.

10 O fator VIII porcino foi isolado do plasma [Fass, D.N. e outros (1982) *Blood* 59: 594]. A seqüência parcial de aminoácido do fator VIII porcino correspondente às porções da seqüência N-terminal de cadeia leve que tem homologia a ceruloplasmina e o fator V de coagulação foram descritos por Church e outros (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 6934. Toole, J.J. e outros (1984) *Nature* 312: 342-347 descreveram o seqüenciamento parcial da extremidade N-terminal de quatro fragmentos de aminoácido de fator VIII porcino porém não caracterizaram os fragmentos em relação às suas posições na molécula do fator VIII. A seqüência de aminoácido do B e parte dos domínios A2 do fator VIII porcino foram relatadas por Toole, J.J. e outros (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 5939-5942. A seqüência de cDNA que codifica o domínio A2 completo de fator VIII porcino e a seqüência de aminoácido prevista e fator VIII híbrido humano / porcino que tem substituições de todos os domínios, todas as subunidades e seqüências de aminoácido específicas foram divulgadas na Patente U.S. 5.364.771 intitulada "Hybrid Human / Porcine factor VIII" concedida em 15 de novembro de 1994 e no WO 93 / 20093 publicada em 14 de outubro de 1993. A seqüência de cDNA que codifica o domínio A2 do fator VIII porcino correspondente aos resíduos 373-740 em fator VIII humano maduro, como apresentado na SEQ ID Nº 1 e a seqüência de aminoácido prevista são apresentadas nas SEQ ID Nºs 3 e 4, respectivamente. Mais recentemente, o nucleotídeo e as seqüências de aminoácido correspondentes de parte do domínio A1 faltando o primeiro aminoácido 198 e do domínio A2 do fator VIII porcino foram relatados no WO

94 / 11503, publicada em 26 de maio de 1994. A seqüência inteira de nucleotídeo que codifica o fator VIII porcino, inclusive o domínio A1 completo, peptídeo de ativação, domínios A3, C1 e C2, assim como a seqüência de aminoácido codificada, foi finalmente obtida por Lollar, como divulgado na

5 Patente U.S. 5.859.204, concedida em 12 de janeiro de 1999 e no WO 97 / 49725, publicada em 31 de dezembro de 1997, ambas aqui incorporadas como referência.

Tanto o fator VIII porcino como o humano são isolados de plasma como uma proteína com duas subunidades. As subunidades, conhecidas

10 como cadeia pesada e cadeia leve, são mantidas juntas por uma ligação não-covalente que requer íons de cálcio ou outros íons de metal divalente. A cadeia pesada de fator VIII contém três domínios, A1, A2 e B, que estão ligados covalentemente. A cadeia leve de fator VIII também contém três domínios, designados A3, C1 e C2. O domínio B não apresenta função biológica conhecida e pode ser removido ou parcialmente removido da molécula

15 proteoliticamente ou por métodos de tecnologia de DNA recombinante sem alteração significativa em qualquer parâmetro de fator VIII que possa ser medido. O fator VIII recombinante humano tem uma estrutura similar e função para fator VIII derivado de plasma, embora ele não seja glicosilado a

20 não ser se expresso em células de mamíferos.

Tanto o fator VIII ativado humano como porcino ("fator VIIIa") têm três subunidades em consequência da clivagem da cadeia pesada entre os domínios, A1 e A2. Esta estrutura é designada A1/A2/A3-C1-C2. O fator VIII humano não é estável sob as condições que estabilizam o fator VIIIa

25 porcino, presumivelmente por causa da associação mais fraca da subunidade A2 do fator VIII humano. A dissociação da subunidade A1 de fator VIIIa humano e porcino está associada com a perda de atividade da molécula do fator VIIIa. Yakhyaev, A. e outros (1997) *Blood* 90: Supl. 1, Abstract.

126, ligação relatada de domínio A2 por receptor de lipoproteína de baixa densidade - proteína relacionada, sugerindo que a captação celular de A2 mediada por tal ligação age para regular para baixo a atividade do fator VIII.

30

A expressão de "fator VIII sem domínio B" é melhorada por inclusão de porções do domínio B. A inclusão daquelas partes do domínio B designadas "SQ" [Lind, P. e outros (1995) acima] foi registrada como resultando em expressão favorável. Nos constructos de "SQ" há falta de todo o
5 domínio B humano exceto os 5 aminoácidos do terminal N do domínio B e os 9 aminoácidos do terminal C do domínio B.

O fator VIII híbrido purificado ou fragmento do mesmo pode ser usado como ensaio para imunorreatividade e atividade de coagulação por ensaios padronizados inclusive, por exemplo o ensaio do fator VIII isento de
10 plasma, o ensaio de coagulação em um estágio e o ensaio imunossorbente ligado à enzima que usa o fator VIII humano recombinante purificado como um padrão.

Outros vetores, inclusive ambos os vetores virais plasmídeo e eucariótico, podem ser usados para expressar um constructo de gene recombinante em células eucarióticas dependendo da preferência e do julgamento do versado na técnica (ver, por exemplo, Sambrook e outros, Capítulo
15 16). Outros vetores e sistemas de expressão, inclusive sistemas bacterianos, de leveduras e de célula de inseto, podem ser usados mas não são preferidos em virtude de diferenças em, ou falta de, glicosilação.

A proteína do fator VIII recombinante pode ser expressa em uma variedade de células comumente usadas para cultura e expressão de proteína recombinante de mamíferos. Em particular, foi descoberto que algumas linhagens de célula de roedores são hospedeiros especialmente úteis para a expressão de proteínas grandes. As linhagens de célula preferidas, disponíveis pela American Type Culture Collection, Rockville, MD, incluem células
20 de rim de bebê hamster e células de ovário de hamster chinesa (CHO) que são cultivadas usando-se procedimentos e meios de rotina.

A base para a maior atividade coagulante de fator VIII porcino parece ser a dissociação rápida mais espontânea da subunidade A2 humana proveniente de fator VIIIa humano do que a subunidade A2 porcina proveniente de fator VIIIa porcino. A dissociação da subunidade A2 leva à perda de
30 atividade. [Lollar, P. e outros (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 1688-1692; Lollar, P.

e outros (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 23652-23657; Fay, P.J. e outros (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 13246-13250].

Moléculas de fator VIII com imunorreatividade reduzida:

Os epítomos que são imunorreativos com anticorpos que inibem a atividade coagulante de fator VIII ("inibidores" ou "anticorpos inibidores") foram caracterizados baseado em relações conhecidas de estrutura-função no fator VIII. Presumivelmente, os inibidores podiam agir por ruptura de qualquer uma das interações macromoleculares associadas com a estrutura de domínio de fator VIII ou suas associações com fator de von Willebrand, trombina, fator Xa, fator IXa ou fator X. No entanto, a maioria dos anticorpos inibidores para o fator VIII humano agem por ligação a epítomos localizados no domínio A2 de 40 kDa ou no domínio C2 de 20 kDa de fator VIII, rompendo funções específicas associadas com estes domínios como descrito por Fulcher e outros (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 7728-7732 e Scandella e outros (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 6152-6156. Além dos epítomos A2 e C2, pode haver um terceiro epítomo no domínio A3 ou C1 da cadeia leve do fator VIII, de acordo com Scandella e outros (1993) *Blood* 82: 1767-1775. O significado deste terceiro epítomo putativo é desconhecido, porém parece que leva em conta uma fração mínima da reatividade do epítomo no fator VIII.

Os anticorpos anti-A2 bloqueiam a ativação do fator X, como demonstrado por Lollar e outros (1994) *J. Clin. Invest.* 93: 2497-2504. Estudos de mapeamento anteriores por mutagênese de deleção descritos por Ware e outros (1992) *Blood Coagul. Fibrinolysis* 3: 703-716, localizaram o epítomo A2 dentro da região da extremidade NH₂-terminal do domínio A2 de 40 kDa. Ensaio imunorradiométrico de competição indicaram que os inibidores A2 reconhecem um epítomo comum ou epítomos estreitamente aglomerados, como descrito por Scandella e outros (1992) *Throm. Haemostas* 67: 665-671 e como demonstrado na Patente U.S. 5.859.204.

As moléculas de fator VIII de animal ou de animal modificado podem ser testadas em seres humanos para sua antigenicidade reduzida e/ou imunogenicidade em experiências clínicas. Em um tipo de experiência,

projetada para determinar se o fator VIII é imunorreativo com anticorpos inibidores, o fator VIII é administrado, de preferência por infusão intravenosa, a aproximadamente 25 pacientes que tenham deficiência de fator VIII que tenham anticorpos que inibem a atividade coagulante do fator VIII humano terapêutico. A dosagem do fator VIII de animal ou de animal modificado está em uma faixa entre 5 e 50 Unidades / kg de peso do corpo, de preferência 10-50 Unidades / kg e mais preferivelmente 40 Unidades / kg de peso do corpo. Aproximadamente 1 hora após cada administração, a recuperação do fator VIII de amostras de sangue é medida em um ensaio de coagulação em um estágio. As amostras são retiradas de novo aproximadamente 5 horas após a infusão e é medida a recuperação. A recuperação total e a taxa de desaparecimento de fator VIII das amostras é uma previsão do título do anticorpo e da atividade inibidora. Se o título do anticorpo for alto, a recuperação do fator VIII habitualmente não pode ser medida. Os resultados da recuperação são comparados aos resultados da recuperação em pacientes tratados com fator VIII humano derivado de plasma, com fator VIII humano recombinante, com fator VIII porcino derivado de plasma e com outras formas terapêuticas usadas de fator VIII ou de substitutos de fator VIII.

Após a identificação de epítomos clinicamente significativos, podem ser expressas moléculas de fator VIII recombinante que tenham reatividade cruzada menor do que ou igual comparada com fator VIII porcino derivado de plasma quando testado in vitro contra uma ampla investigação de plasmas inibidores. Pode ser feita mutagênese adicional em regiões epitópicas para reduzir a reatividade cruzada. A reatividade cruzada reduzida, embora desejável, não é necessária para produzir um produto que pode ter vantagens sobre o concentrado de fator VIII porcino derivado de plasma, que pode produzir efeitos colaterais provenientes de proteínas porcinas contaminantes ou de agentes infecciosos contaminantes tais como vírus ou príons. Uma molécula de fator VIII porcino ou porcino modificado não conterá proteínas porcinas estranhas.

Ensaio para diagnóstico.

O cDNA de fator VIII e/ou a proteína expressa partindo do mes-

mo, em todo ou em parte, pode ser usado em ensaios como reagentes para diagnóstico para a detecção de anticorpos inibidores a fator VIII humano ou animal ou a fator VIII modificado em substratos, inclusive, por exemplo, amostras de soro e de fluidos do corpo de pacientes humanos com deficiência de fator VIII. Estes ensaios de anticorpo incluem ensaios tais como ensaios ELISA, imunoblots, radioimunoensaios, ensaios de imunodifusão e ensaio de atividade biológica de fator VIII (por exemplo, por ensaio de coagulação). As técnicas para a preparação destes reagentes e os métodos para uso dos mesmos são conhecidos dos versados na técnica. Por exemplo, um imunoensaio para detecção de anticorpos inibidores em uma amostra de soro do paciente podem incluir a reação da amostra teste com uma quantidade suficiente do fator VIII a ser testado que um complexo detectável pode ser formado com os anticorpos inibidores na amostra do fator VIII teste é evidentemente antigênico.

Podem ser preparadas sondas de ácido nucléico e de aminoácido baseadas na sequência do cDNA do fator VIII híbrido ou molécula de proteína ou fragmentos da mesma. Em algumas modalidades, estas podem ser marcadas usando-se corantes ou marcas enzimáticas, fluorescentes, quimioluminescentes ou radioativas que são comercialmente disponíveis. As sondas de aminoácido podem ser usadas, por exemplo, para selecionar soros ou outros fluidos do corpo quando a presença de inibidores a fator VIII humano, animal ou humano / animal híbrido for suspeita. Os níveis de inibidores podem ser avaliados quantitativamente em pacientes e comparados a controles saudáveis e podem ser usados, por exemplo, para determinar se um paciente com uma deficiência de fator VIII pode ser tratado com um fator VIII animal ou animal modificado. As sondas de cDNA podem ser usadas, por exemplo, para fins de pesquisa em seleção de coleções de DNA.

Composições Farmacêuticas.

As composições farmacêuticas que contêm fator VIII porcino recombinante ou porcino modificado, sozinho ou em combinação com compostos farmacêuticos apropriados para estabilização, veículos de liberação e/ou veículos carreadores, são preparados de acordo com métodos conhe-

cidos, como descrito em Remington's *Pharmaceutical Sciences* de por E.W. Martin.

Em uma modalidade preferida, os veículos ou os veículos de liberação preferidos para infusão intravenosa são soro fisiológico ou soro fisiológico tamponado com fosfato.

Em uma outra modalidade preferida, os compostos adequados para estabilização, os veículos de liberação e os veículos carreadores incluem porém não estão limitados a outras proteínas humanas ou animais tal como albumina.

São também preferidas vesículas de fosfolípídeo ou suspensões lipossomais como veículos farmaceuticamente aceitáveis ou como veículos de liberação. Estes podem ser preparados de acordo com métodos conhecidos dos versados na técnica e podem conter, por exemplo, fosfatidilserina / -fosfatidilcolina ou outras composições de fosfolípídeo ou detergentes que juntas conferem uma carga negativa à superfície, pois o fator VIII se liga a membranas de fosfolípídeo carregadas negativamente. Podem ser preparados lipossomos dissolvendo-se lipídeo (s) apropriado (s) (tais como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil fosfatidil colina e colesterol) em um solvente inorgânico que é então evaporado, deixando para trás uma fina película de lipídeo seco sobre a superfície do recipiente. Uma solução aquosa do fator VIII híbrido é então introduzida no recipiente. O recipiente é então girado manualmente para liberar material de lipídeo dos lados do recipiente e para dispersar agregados de lipídeo, formando desse modo a suspensão lipossomal.

O fator VIII porcino recombinante ou porcino modificado pode ser combinado com outros compostos adequados para estabilização, veículos de liberação e/ou veículos carreadores, inclusive fatores de coagulação dependentes de vitamina K, fator de tecido e fator de von Willebrand (vWf) ou um fragmento de vWf que contenha o sítio de ligação do fator VIII e polissacarídeos tal como sacarose.

O fator VIII porcino recombinante ou porcino modificado também pode ser liberado por terapia de gene da mesma maneira que o fator VIII

humano pode ser liberado, usando-se meios de liberação tais como vetores retrovirais. Este método consiste em incorporar o constructo de fator VIII desejado de cDNA a células humanas que são transplantadas diretamente em um paciente deficiente em fator VIII ou que são colocadas em um dispositivo

5 que pode ser implantado, permeável às moléculas de fator VIII porém impermeável às células que é então transplantado. O método preferido será transferência de gene retroviral-mediada. Neste método, um gene exógeno (por exemplo um cDNA de fator VIII) é clonado no genoma de um retrovírus modificado. O gene é inserido no genoma da célula hospedeira por maquinaria viral quando ele será expresso pela célula. O vetor retroviral é modificado

10 de modo que ela não produza vírus, prevenindo infecção viral do hospedeiro. Os princípios gerais para este tipo de terapia são conhecidos dos versados na técnica e foram revistos na literatura [por exemplo, Kohn, D.B. e outros (1989) *Transfusion* 29: 812-820].

15 O fator VIII porcino ou porcino modificado pode ser estocado ligado a vWf para aumentar a meia vida e o prazo de validade da molécula híbrida. Adicionalmente, a liofilização do fator VIII pode melhorar os rendimentos de moléculas ativas na presença de vWf. Podem ser empregados métodos habituais para estocagem de fator VIII humano e animal usado por

20 fornecedores comerciais para estocagem de fator VIII recombinante. Estes métodos incluem: (1) liofilização de fator VIII em um estado parcialmente purificado (como um "concentrado" de fator VIII que é infundido em purificação adicional); (2) purificação por imunoafinidade de fator VIII pelo método de Zimmerman e liofilização na presença de albumina, que estabiliza o fator

25 VIII; (3) liofilização de fator VIII recombinante na presença de albumina.

Adicionalmente, foi descoberto que o fator VIII porcino ou porcino modificado é indefinidamente estável a 4°C em NaCl 0,6 M, MES 20 mM e CaCl₂ 5 mM a pH 6,0 e também pode ser estocado congelado nestas soluções tamponadoras e descongelado com perda de atividade mínima.

30 Métodos de Tratamento

O fator VIII porcino recombinante ou porcino modificado é usado para tratar hemorragia descontrolada em consequência de deficiência de

fator VIII (por exemplo, hemorragia intra-articular, intracraniana ou gastrointestinal) em hemofílicos com e sem anticorpos inibidores e em pacientes com deficiência de fator VIII adquirida em virtude do desenvolvimento de anticorpos inibidores. Os materiais ativos são de preferência administrados intravenosamente.

Adicionalmente, o fator VIII porcino recombinante ou porcino modificado pode ser administrado por transplante de células engenheiradas geneticamente para produzir a proteína por implante de um dispositivo que contém tais células, como descrito acima.

Em uma modalidade preferida, composições farmacêuticas de fator VIII porcino recombinante ou porcino modificado sozinho ou em combinação com estabilizadores, veículos de liberação e/ou carreadores são infundidos intravenosamente em pacientes de acordo com o mesmo procedimento que é usado para a infusão de fator VIII humano ou animal.

As dosagens de tratamento de composição de fator VIII porcino recombinante ou porcino modificado que devem ser administradas a um paciente que necessite tal tratamento irão variar dependendo da gravidade da deficiência de fator VIII. Geralmente, o nível de dosagem é ajustado em frequência, duração e unidades em manutenção com a gravidade e a duração de cada episódio de hemorragia do paciente. Conseqüentemente, o fator VIII é incluído em um veículo farmaceuticamente aceitável, um veículo de liberação ou estabilizador em uma quantidade suficiente para liberar a um paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína para fazer parar a hemorragia, como medido por dosagem padrão de coagulação.

O fator VIII é definido classicamente como aquela substância presente em plasma de sangue normal que corrige o defeito de coagulação em plasma derivado de indivíduos com hemofilia A. A atividade coagulante in vitro de formas de fator VIII purificado e parcialmente purificado é usada para calcular a dose de fator VIII para infusões em pacientes humanos e é um indicador confiável de atividade recuperada do plasma do paciente e de correção do defeito de hemorragia in vivo. Não há discrepâncias relatadas entre a dosagem padrão de novas moléculas de fator VIII in vitro e seu com-



portamento no modelo de infusão no cão ou em pacientes humanos, de acordo com Lusher, J.M. e outros 328 *New Engl. J. Med.* 328: 453-459; Pittman, D.D. e outros (1992) *Blood* 79: 389-397 e Brinkhous e outros (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 8752-8755.

5 Habitualmente, o nível de atividade do fator VIII de plasma desejado a ser atingido no paciente pela administração do fator VIII porcino recombinante ou porcino modificado está na faixa de 30-100% do normal. Em um modo de administração preferido do fator VIII terapêutico, a composição é fornecida intravenosamente a uma dosagem preferida na faixa de
10 desde aproximadamente 5 até 50 unidades / kg de peso do corpo, mais preferivelmente em uma faixa de 10-50 unidades / kg de peso do corpo e mais preferivelmente ainda a uma dosagem de 20-40 unidades / kg de peso do corpo; a frequência de intervalo está na faixa de desde aproximadamente 8 até 24 horas (em hemofílicos gravemente afetados); e a duração do trata-
15 mento em dias está na faixa de desde 1 até 10 dias ou até que o episódio de hemorragia esteja resolvido. Ver, por exemplo, Roberts, H.R., e M.R. Jones, "Hemophilia and Related Conditions – Congenital Deficiencies of Prothrombin (Factor II, Factor V, and Factors VII to XII)," Cap. 153, 1453-1474, 1460, em Hematology, Williams, W.J. e outros, ed. (1990). Os pacientes com inibi-
20 dores podem precisar de uma quantidade diferente de fator VIII porcino recombinante ou porcino modificado e sua forma anterior de fator VIII. Por exemplo, os pacientes podem precisar de menos fator VIII porcino recombinante ou porcino modificado por causa de sua mais alta atividade específica do que fator VIII humano e em reatividade decrescente de anticorpo. Como
25 no tratamento com fator VIII derivado de plasma humano ou porcino, a quantidade de fator VIII terapêutico infundida é definida pelo ensaio de coagulação de fator VIII em uma etapa e, em casos selecionados, é determinada a recuperação in vivo por medida do fator VIII no plasma do paciente após a infusão. Deve ser entendido que para qualquer sujeito em particular,
30 deviam ser ajustados regimes de dosagem específicos com o passar do tempo de acordo com a necessidade do indivíduo e com o julgamento profissional da pessoa que administra ou que supervisiona a administração das

composições e que as faixas de concentração aqui apresentadas são apenas para exemplo e não pretendem limitar o âmbito da prática da composição reivindicada.

5 O tratamento pode assumir a forma de uma única administração intravenosa da composição ou administração periódica ou contínua durante um extenso período de tempo, quando necessário. Alternativamente, o fator VIII terapêutico pode ser administrado subcutaneamente ou oralmente com lipossomas em uma ou em diversas doses a intervalos de tempo variáveis.

10 O fator VIII porcino recombinante ou porcino modificado também pode ser usado para tratar hemorragia descontrolada em consequência da deficiência do fator VIII em hemofílicos que desenvolveram anticorpos ao fator VIII humano. Neste caso, não é necessária a atividade coagulante que é superior àquela de fator VIII humano ou animal apenas. A atividade coagulante que é inferior àquela de fator VIII humano (isto é, menor do que
15 3.000 unidades / mg) será útil se aquela atividade não for neutralizada por anticorpos no plasma do paciente.

Foi demonstrado neste caso, que os fatores VIII porcino recombinante ou porcino modificado podem diferir em atividade específica do fator VIII humano. As proteínas do fator VIII que têm maior atividade pró-coagulante provenientes do fator VIII humano são úteis no tratamento de hemofilia porque serão necessárias dosagens menores para corrigir uma deficiência de fator VIII do paciente. Os fatores VIII que têm atividade pró-coagulante mais baixa do que o fator VIII humano também são adequados para uso terapêutico contanto que estes tenham pelo menos 1% de atividade
20 específica comparados ao fator VIII humano normal. Um fator VIII da presente invenção que tenha atividade pró-coagulante é, portanto, definido como tendo pelo menos 1% da atividade específica do fator VIII humano.
25

A molécula de fator VIII porcino recombinante ou porcino modificado e os métodos para o isolamento, caracterização, obtenção e uso da
30 mesma geralmente descrita acima, será melhor compreendida com referência aos exemplos não limitativos a seguir.

Exemplo 1: Ensaio de fator VIII porcino e de fator VIII híbrido humano / porcino.

O fator VIII porcino tem mais atividade coagulante do que o fator VIII humano, baseado na atividade específica da molécula. Esta conclusão é baseada no uso de curvas padronizadas apropriadas que permitem que o fator VIII porcino humano seja comparado razoavelmente. Os ensaios de coagulação são baseados na capacidade de o fator VIII abreviar o tempo de coagulação de plasma derivado de um paciente com hemofilia A. Foram empregados dois tipos de ensaios: ensaio em uma etapa e ensaio em duas etapas.

No ensaio em uma etapa, 0,1 ml de plasma de hemofilia A (George King Biomedical, Inc.) foi incubado com 0,1 ml de reagente tromboplastina parcial ativado (APTT) (Organon Teknika) e amostra de 0,01 ml ou padrão, que consiste em plasma humano normal citrado, diluído, durante 5 minutos a 37°C em banho-maria. A incubação foi seguida pela adição de 0,1 ml de CaCl_2 20 mM e o tempo para o desenvolvimento de um coágulo de fibrina foi determinado por inspeção visual.

Uma unidade de fator VIII é definida como a quantidade presente em 1 ml de plasma humano normal citrado. Com plasma humano como padrão, as atividades de fator VIII porcino e humano foram comparadas diretamente. Foram obtidas diluições do padrão de plasma ou de proteínas purificadas em NaCl 0,15 M, HEPES 0,02 M, pH 7,4. A curva padrão foi construída baseada em 3 ou 4 diluições de plasma, a diluição mais alta sendo 1/50, e no $\log_{10}$ do tempo de coagulação comparado graficamente contra o $\log_{10}$ da concentração do plasma, que resulta em um gráfico linear. As unidades de fator VIII em uma amostra desconhecida foram determinadas por interpolação da curva padrão.

O ensaio em uma etapa se baseia na ativação endógena de fator VIII por ativadores formados no plasma de hemofilia A, ao passo que o ensaio em duas etapas mede a atividade pró-coagulante do fator VIII pré-ativado. Em um ensaio em duas etapas, as amostras que contêm fator VIII que tinham reagido com trombina foram adicionadas a uma mistura de trom-



boplastina parcial ativada e plasma de hemofilia A humana que tinha sido pré-incubado durante 5 minutos a 37°C. Os tempos de coagulação resultantes foram então convertidos a unidades/ml, baseado na mesma curva padrão para seres humanos descrita acima. A atividade relativa em ensaio em duas etapas era maior do que no ensaio em uma etapa porque o fator VIII foi pré-ativado.

Exemplo 2: Caracterização da diferença funcional entre o fator VIII humano e porcino.

O isolamento de fator VIII porcino e humano derivado de plasma e fator VIII recombinante humano foi descrito na literatura em Fulcher, C.A. e outros (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 1648-1652; Toole e outros (1984) *Nature* 312: 342-347 (Genetics Institute); Gitschie e outros (1984) *Nature* 312: 326-330 (Genentech); Wood e outros (1984) *Nature* 312: 330-337 (Genentech); Vehar e outros 312 *Nature* 312: 337-342 (Genentech); Fass e outros (1982) *Blood* 59: 594; Toole e outros (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5939-5942. Isto pode ser realizado de diversas maneiras. Todas estas preparações são similares em composição de subunidade, embora haja uma diferença funcional em estabilidade entre o fator VIII humano e porcino.

Para comparação de fator VIII recombinante humano e porcino, preparações de fator VIII recombinante humano altamente purificadas (Cutter Laboratories, Berkeley, CA) e fator VIII porcino [imunopurificado como descrito em Fass e outros (1982) *Blood* 59: 594] foram sujeitas a cromatografia líquida a alta pressão (HPLC) sobre uma coluna de troca aniônica Mono QTM (Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ) (Pharmacia, Inc.). As finalidades da etapa HPLC de Mono QTM foram eliminação de impurezas mínimas de troca de fator VIII humano e porcino em uma solução tamponadora comum para fins de comparação. Pequenos frascos contendo 1000-2000 unidades de fator VIII foram reconstituídos com 5 ml de H₂O Foi então adicionado Hepes (2 M a pH 7,4) a uma concentração final de 0,02 M. O fator VIII foi aplicado a uma coluna Mono QTM HR 5/5 equilibrada em NaCl 0,15 M, Hepes 0,02 M, CaCl₂ 5 mM a pH 7,4 (Tampão A mais NaCl 0,15 M); lavada com 10 ml de Tampão A + NaCl 0,15 M; e eluída com um gradiente linear de

20 ml, NaCl 0,15 M até 0,90 M em Tampão A a uma vazão de 1 ml/minuto.

Para comparação de fator VIII derivado de plasma humano (purificado por HPLC Mono QTM) e fator VIII porcino, purificado por imunoafinidade, o fator VIII porcino derivado de plasma foi diluído 1:4 com Hepes 0,04 M, CaCl₂ 5 mM, Tween-80 a 0,01%, a pH 7,4 e sujeito a HPLC Mono QTM sob as mesmas condições descritas no parágrafo anterior para o fator VIII humano. Estes procedimentos para isolamento de fator VIII humano e porcino são padronizados para os versados na técnica.

As frações da coluna foram submetidas a ensaio para atividade do fator VIII por um ensaio de coagulação em uma etapa. Os resultados médios dos ensaios, expressos em unidades de atividade por A₂₈₀ de material, são fornecidos na Tabela II e indicam que o fator VIII porcino tem pelo menos uma atividade seis vezes maior do que o fator VIII humano quando é usado ensaio em uma etapa.

Tabela II

Comparação da Atividade Coagulante de Fator VIII Humano e Porcino.

	atividade (U/ A ₂₈₀)
Porcino	21.300
Derivado de plasma humano	3.600
Recombinante humano	2.400

Exemplo 3: Comparação da estabilidade de fator VIII humano e porcino

Os resultados do ensaio em uma etapa para o fator VIII refletem a ativação do fator VIII a fator VIIIa na amostra e possivelmente perda de atividade do fator VIIIa formado. Foi feita uma comparação direta da estabilidade de fator VIII humano e porcino. Amostras de HPLC Mono QTM (Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ) foram diluídas até a mesma concentração e composição tamponadora e reagidas com trombina. Em várias ocasiões, as amostras foram removidas para ensaio de coagulação em duas etapas. Tipicamente, o pico de atividade (a 2 minutos) era 10 vezes maior para o fator VIIIa porcino do que para o humano e as atividades tanto do fator VIIIa porcino como do humano diminuíram subsequenteemente, com a atividade do fator VIIIa humano decrescendo mais rapidamente.

Geralmente, as tentativas para isolar o fator VIIIa humano não são bem sucedidas até mesmo quando são usadas condições que produzem o fator VIIIa porcino estável. Para demonstrar isto, o fator VIII humano purificado em HPLC Mono QTM foi ativado com trombina e sujeito à troca catiônica em HPLC Mono QTM (Pharmacia, Inc.) sob condições que produzem o fator VIIIa porcino estável, como descrito por Lollar e outros (1989) *Biochemistry* 28: 666.

Fator VIII humano, 43 µg/ml (0,2 µM) em NaCl 0,2 M, Hepes 0,01 M, CaCl₂ 2,5 mM a pH 7,4, em volume total de 10 ml, foi reagido com trombina (0,036 µM) durante 10 minutos em cujo tempo foi adicionada FPR-CH₂Cl D-fenil-prolil-arginil-clorometil cetona a uma concentração de 0,2 µM para inativação irreversível de trombina. A mistura foi então diluída 1:1 com ácido 2-(N-morfolino) etano sulfônico (MES) 40 mM, CaCl₂ 5 mM, a pH 6,0 e carregado a 2 ml/minuto sobre uma coluna HPLC Mono STM HR 5/5 (Pharmacia, Inc.) equilibrada em MES 5 mM, CaCl₂ 5 mM, a pH 6,0 (Tampão B) mais NaCl 0,1 M. O fator VIIIa foi eluído sem lavagem da coluna com um gradiente de 20 ml desde NaCl 0,1 M até NaCl 0,9 M em Tampão B a 1 ml/minuto.

A fração com atividade coagulante no ensaio em duas etapas foi eluída como um único pico sob estas condições. A atividade específica da fração do pico era aproximadamente 7.500 U/ A₂₈₀. Eletroforese em gel em dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) do pico de fator VIIIa em Mono STM, seguida por aplicação de mancha com prata da proteína, revelou duas faixas correspondentes a um derivado heterodimérico (A3-C1-C2/A1) de fator VIII. Embora o fragmento A2 não fosse identificado por aplicação de mancha com prata sob estas condições por causa de sua baixa concentração, ele foi identificado como um constituinte em traços por marcação com ¹²⁵I.

Em contraste aos resultados com o fator VIII, o fator VIIIa porcino isolado por HPLC Mono STM sob as mesmas condições tinha uma atividade específica de 1,6 x 10⁶ U/ A₂₈₀. A análise de fator VIIIa porcino por SDS-PAGE revelou 3 fragmentos correspondentes a subunidades A1, A2 e A3-C1-C2, demonstrando que o fator VIIIa porcino possui três subunidades.

Os resultados de HPLC Mono STM de preparações de fator VIII

humano ativado por trombina a pH 6,0 indicam que o fator VIIIa humano é lábil sob condições que fornecem o fator VIIIa porcino estável. No entanto, embora fossem identificadas quantidades em traços de fragmento A2 na fração do pico, a determinação de se a atividade coagulante resultava de pequenas quantidades fator VIIIa heterotrimérico ou de fator VIIIa heterodimérico que tem uma baixa atividade específica não foi possível apenas por este método.

Uma maneira de isolar fator VIIIa humano antes que este perca sua subunidade A2 é desejável para resolver esta questão. Para esta finalidade, o isolamento foi realizado em um procedimento que envolve a redução do pH dos tamponadores Mono STM a pH 5. O fator VIII humano purificado por Mono QTM (0,5 mg) foi diluído com H₂O para fornecer uma composição final de 0,25 mg/ml (1 μ m) de fator VIII em NaCl 0,25 M, Hepes 0,01 M, CaCl₂ 2,5 mM, Tween-80 a 0,005%, a pH 7,4 (volume total 7,0 ml). A trombina foi adicionada a uma concentração final de 0,072 μ m e deixada reagir durante 3 minutos. A trombina foi então inativada com FPR-CH₂Cl (0,2 μ m). A mistura foi então diluída a 1:1 com acetato de sódio 40 mM, CaCl₂ 5 mM, Tween-80 a 0,01%, a pH 5,0 e carregada a 2 ml/minuto sobre uma coluna Mono STM HR 5/5 HPLC equilibrada em acetato de sódio 0,01 mM, CaCl₂ 5 mM, Tween-80 a 0,01%, a pH 5,0, mais NaCl 0,1 M. O fator VIIIa foi eluído sem lavagem da coluna com um gradiente de 20 ml desde NaCl 0,1 M até NaCl 1,0 M na mesma solução tamponadora a 1 ml/minuto. Isto resultou na recuperação de atividade coagulante em um pico que continha quantidades detectáveis do fragmento A2 como apresentado por SDS-PAGE e aplicação de mancha com prata. A atividade específica da fração do pico era dez vezes maior do que aquela recuperada a pH 6,0 (75.000 (U/ A₂₈₀ v. 7.500 U/ A₂₈₀). No entanto, em contraste com o fator VIII porcino isolado a pH 6,0, que é indefinidamente estável a 4°C, a atividade do fator VIIIa humano diminuía regularmente durante um período de várias horas após eluição de Mono STM. Adicionalmente, a atividade específica do fator VIIIa purificado a pH 5,0 e dosado imediatamente é apenas 5% daquela do fator VIIIa porcino, indicando que ocorria substancial dissociação antes do ensaio.

Estes resultados demonstram que tanto o fator VIIIa humano como o porcino são compostos de três subunidades (A1, A2 e A3-C1-C2). A dissociação da subunidade A2 é responsável pela perda de atividade que tanto do fator VIIIa humano como do porcino sob certas condições, tais como concentração iônica fisiológica, pH e concentração. A estabilidade relativa do fator VIIIa porcino sob certas condições é consequência da associação mais forte da subunidade A2.

Exemplo 4: Isolamento e seqüenciamento de DNA que codifica o domínio A2 de fator VIII porcino.

Somente a seqüência de nucleotídeo que codifica o domínio B e parte do domínio A2 do fator VIII porcino foi seqüenciado anteriormente [Toole e outros (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 5939-5942]. O cDNA e as seqüências de aminoácido previstas (SEQ ID N^{os} 3 e 4, respectivamente) para o inteiro domínio A2 do fator VIII porcino são divulgados aqui.

O domínio A2 do fator VIII porcino foi clonado por transcrição reversa de RNA total do baço porcino e amplificação por PCR; foram usados iniciadores degenerados baseados na seqüência de cDNA de fator VIII humano conhecido e um iniciador porcino exato baseado em uma parte da seqüência de fator VIII porcino. Um produto de PCR de 1 kb foi isolado e amplificado por inserção em um vetor de fagomídio BluescriptTM (Stratagene).

O domínio A2 porcino foi completamente seqüenciado por seqüenciamento de dideoxi. As seqüências de cDNA e de aminoácido previstas são como descritas nas SEQ ID N^{os} 3 e 4, respectivamente.

Exemplo 5: Seqüência completa de DNA que codifica o fator VIII porcino.

Fragmento de Klenow, linkers ClaI fosforilados, linkers NotI, T4 ligase e *Taq* DNA polimerase foram adquiridos de Promega (Madison, Wisconsin). O polinucleotídeo quinase foi adquirido de Life Technologies, Inc., Gaithersburg, Maryland. $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (Redivue, > 5000 Ci/mmol) foi adquirido de Amersham, pBluescript II KS- e as células Epicurean XL1-Blue de *E. coli* foram adquiridas de Stratagene (La Jolla, Califórnia). Oligonucleotídeos sintéticos foram adquiridos de Life Technologies, Inc. ou Cruachem, Inc. Foram usados iniciadores 5'-fosforilados quando foram produzidos produtos de

PCR para fins de clonagem. A numeração de nucleotídeo (nt) de oligonucleotídeos usados como iniciadores para reação em cadeia de polimerase (PCR) amplificação de cDNA de fVIII ou DNA genômico usa o cDNA de fVIII como referência (Wood e outros (1984) *supra*).

5 RNA total de baço porcino foi isolado por extração com tiocianato ácido de guanidínio – fenol – clorofórmio [Chomczynski e outros (1987) *Anal. Biochem.* 162: 156-159]. Foi preparado cDNA porcino partindo de RNA de baço total usando-se transcriptase reversa (RT) do vírus da leucemia mu-
rina de Moloney e hexâmeros desordenados para iniciar a reação (First
10 Strand cDNA Synthesis Kit, Pharmacia Biotech) a não ser se for indicado de outra maneira. As reações RT continham Tris-Cl 45 mM, pH 8,3, KCl 68 mM, DTT 15 mM, $MgCl_2$ 9 mM, 0,08 mg/ml de albumina de soro bovino e trifosfato de desoxinucleotídeo 1,8 mM (dNTP). O DNA genômico porcino foi iso-
lado de baço usando-se um procedimento padrão (Strauss, W. M. (1995) em
15 Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel e outros, editores, John Wiley & Sons, pp. 2.2.1-2.2.3). O isolamento de DNA de géis de agarose foi feito usando-se GeneClean II (Bio 101) ou Quiex II Gel Extraction Kit (Qiagen).

Foram feitas reações de PCR usando-se um termociclador Hybaid
20 OmniGene. Para reações de PCR que empregam *Taq* DNA polimerase, as reações incluíram $MgCl_2$ 0,6 mM, dNTPs 0,2 mM, iniciadores de oligonucleotídeo 0,5 μ M, 50 U/ml de polimerase e 0,1 volume de mistura da reação de cDNA de primeiro filamento. Exceto quando indicado de outra forma, os produtos de PCR foram purificados com gel, as suas extremidades tornadas
25 inativas com fragmento de Klenow, precipitados com etanol e ligados ao sítio EcoRV de pBluescript II KS- desfosforilado ou ligado com linkers ClaI fosforilados usando-se T4 ligase, digerido com ClaI, purificado com cromatografia em Sephacryl S400 e ligado a pBluescript II KS- desfosforilado cortado por ClaI. As ligações foram feitas usando-se T4 DNA ligase (kit de ligação rápida
30 de DNA, Boehringer Mannheim) exceto quando indicado de outra forma. Os plasmídeos pBluescript II KS- contendo inserção foram usados para transformar células Epicurean XL1-Blue de *E. coli*.

O seqüenciamento do DNA de plasmídeo foi feito usando-se um seqüenciador de DNA automatizado da Applied Biosystems 373a e o kit terminador de corante PRISM ou manualmente usando-se kit de seqüenciamento Sequenase v. 2.0 (Amersham Corporation). O seqüenciamento direto de produtos de PCR, inclusive marcação da extremidade ^{32}P de oligonucleotídeos foi feito usando-se um protocolo de seqüenciamento de ciclo (dsDNA Cycle Sequencing System, Life Technologies).

Isolamento de clones cDNA de fVIII porcino contendo seqüência 5' UTR, peptídeo sinal e códons de domínio A1

O cDNA 5' de fVIII porcino ao domínio A2 foi amplificado por RT-PCR aninhada de RNA total de baço de porca usando-se um protocolo de amplificação 5' rápida de extremidades de cDNA (5'-RACE) (Marathon cDNA, Amplification, Clontech, Versão PR55453). Isto incluía a síntese de cDNA de primeiro filamento usando-se um oligo (dT) iniciador lock-docking (Borson, N.D. e outros (1992) *PCR Methods Appl.* 2: 144-148], síntese de DNA de segundo filamento que usa polimerase I de DNA de *E. coli* e ligação com um adaptador de filamento duplo 5' estendido, SEQ ID N°: 5

5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CTC GAG CGG CCG CCC GGG CAG GT-3
3'-H₂N-CCCGTCCA-PO₄-5'

cujo filamento curto foi bloqueado na extremidade 3' com um grupo amino para reduzir iniciação não-específica de PCR e que era complementar aos 8 nucleotídeos na extremidade 3' (Siebert, P.D. e outros (1995) *Nucleic Acids. Res.* 23: 1087-1088). A primeira rodada de PCR foi feita usando-se um oligonucleotídeo específico ao adaptador, SEQ ID N°:

6 5'-CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC-3' (designada AP1) como iniciador sentido e um oligonucleotídeo específico do domínio A2 de fVIII porcino SEQ ID N°: 7 5'-CCA TTG ACA TGA AGA CCG TTT CTC-3' (nt 2081-2104) como iniciador anti-sentido. A segunda rodada de PCR foi feita usando-se um oligonucleotídeo aninhado, específico a adaptador

SEQ ID N°: 8 5'-ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC-3' (designado AP2) como iniciador sentido e um oligonucleotídeo aninhado, específico a domínio A2 porcino SEQ ID N°: 9 5' -GGG TGC AAA GCG CTG ACA TCA

GTG- 3' (nt 1497 -1520) como iniciador anti-sentido. PCR foi realizada usando-se um kit comercial (Advantage cDNA PCR core kit) que emprega um protocolo de início a quente mediado por anticorpo [Kellogg, D.E. e outros (1994) *BioTechniques* 16: 1134-1137]. As condições de PCR incluíram desnaturação a 94°C durante 60 segundos, seguido por 30 ciclos (primeira PCR) ou 25 ciclos (segunda PCR) de desnaturação durante 30 segundos a 94°C, recozimento durante 30 segundos a 60°C e alongamento durante 4 minutos a 68°C usando-se controle de temperatura do tubo. Este procedimento forneceu um produto proeminente de $\approx 1,6$ kb o que era coerente com a amplificação de um fragmento que se estende aproximadamente 150 pb para dentro do 5' UTR. O produto de PCR foi clonado no pBluescript usando-se linkers ClaI. As inserções de quatro clones foram seqüenciadas em ambas as direções.

A seqüência destes clones incluía regiões correspondentes a 137 pb do 5' UTR, o peptídeo sinal, o domínio A1 e parte do domínio A2. Foi atingido um consenso em pelo menos 3 dos 4 sítios. No entanto, os clones continham uma média de 4 mutações aparentes geradas por PCR, presumivelmente em virtude das múltiplas rodadas de PCR necessárias para gerar um produto clonável. Portanto, usou-se a seqüência obtida da região de peptídeo sinal para projetar um iniciador de PCR fosforilado de filamento de sentido, SEQ ID Nº: 10 5'-CCT CTC GAG CCA CCA TGT CGA GCC ACC **ATG** CAG CTA GAG CTC TCC ACC TG-3', representada RENEOPIGSP, para a síntese de um outro produto de PCR para confirmar a seqüência e para clonagem em um vetor de expressão. A seqüência em negrito representa o códon inicial. A seqüência 5' para isto representa a seqüência idêntica àquela 5' do sítio de inserção no vetor de expressão de mamíferos ReNeo usado para a expressão de fVIII (Lubin e outros (1994) acima). Este sítio inclui um sítio de clivagem XhoI (sublinhado). RENEOPIGSP e o oligonucleotídeo nt 1497-1520 foram usados para iniciar uma reação de PCR mediada por Taq DNA polimerase que usa cDNA de baço feminino porcino como uma matriz. DNA polimerases provenientes de diversos outros fabricantes falharam no fornecimento de um produto detectável. As condições de

PCR incluíam a desnaturação a 94°C durante quatro minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação durante 1 minuto a 94°C, recozimento durante 2 minutos a 55°C e alongamento durante 2 minutos a 72°C, seguido por uma etapa de alongamento final durante 5 minutos a 72°C. O produto de PCR foi clonado em pBluescript usando-se linkers ClaI. As inserções de dois destes clones foram seqüenciadas em ambas as direções e combinaram a seqüência de consenso.

Isolamento de clones cDNA de fVIII porcino contendo A3, C1 e 5' metade dos códons de domínio C2.

10 Inicialmente, foram clonados dois produtos de RT –PCR de baço porcino, correspondentes a um fragmento de domínio B-A3 (nt 4519-5571) e um fragmento de domínio C1-C2 (nt 6405-6990). A extremidade 3' do domínio C2 que foi obtida estendeu-se para a região 26 de éxon, que é o éxon terminal em fVIII. O produto B-A3 foi obtido usando-se o iniciador de domínio

15 B porcino-específico, SEQ ID Nº: 11 5' CGC GCG GCC GCG CAT CTG GCA AAG CTG AGT T 3', em que a região sublinhada corresponde a uma região no fVIII porcino que se alinha com nt 4519-4530 no fVIII humano. A região 5' do oligonucleotídeo inclui um sítio NotI que foi originalmente pretendido para fins de clonagem. O iniciador anti-sentido usado na geração do

20 produto B-A3, SEQ ID Nº: 12 5'-GAA ATA AGC CCA GGC TTT GCA GTC RAA-3' foi baseado no complemento reverso da seqüência de cDNA de fVIII humano a nt 5545-5571. A reação de PCR continha KCl 50 mM, Tris-Cl 10 mM, pH 9,0, Triton X-100 a 0.1%, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 2,5 mM, iniciadores 20 µM, 25 unidade /ml de Taq DNA polimerase e 1/20 volume de mistura da

25 reação RT. As condições de PCR foram desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação durante 1 minuto a 94°C, recozimento durante 2 minutos a 50°C e alongamento durante 2 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram fosforilados usando-se T4 DNA quinase e foram adicionados linkers NotI. Após corte com NotI, os fragmentos de PCR

30 foram clonados no sítio NotI de BlueScript II KS- e transformados em células XL1-Blue.

O produto C1-C2 foi obtido usando-se a seqüência de cDNA

humano conhecido para sintetizar iniciadores sentido e anti-sentido, SEQ ID N^o: 13 5'-AGG AAA TTC CAC TGG AAC CTT N-3' (nt 6405-6426) e SEQ ID N^o: 14 5'-CTG GGG GTG AAT TCG AAG GTA GCG N-3' (complemento reverso de nt 6966-6990), respectivamente. As condições de PCR eram idênticas àsquelas usadas para gerar o produto B-A2. O fragmento resultante foi ligado ao vetor de clonagem pNOT usando-se o Prime PCR Cloner Cloning System (5 Prime-3 Prime, Inc., Boulder, Colorado) e cultivado em células JM109.

Os plasmídeos B-A3 e C1-C2 foram parcialmente seqüenciados para se obter os oligonucleotídeos sentido e anti-sentido porcino-específicos, SEQ ID N^o: 15 5'-GAG TTC ATC GGG AAG ACC TGT TG-3' (nt 4551-4573) e SEQ ID N^o: 16 5'-ACA GCC CAT CAA CTC CAT GCG AAG-3' (nt 6541-6564), respectivamente. Estes oligonucleotídeos foram usados como iniciadores para gerar um produto de RT-PCR de 2013 pb usando-se um kit de PCR de cDNA Clontech Advantage. Este produto, que corresponde a nt 4551-6564 humano, inclui a região correspondente ao peptídeo de ativação de cadeia leve (nt 5002-5124), domínio A3 (nt 5125-6114) e a maior parte do domínio C1 (nt 6115-6573). A seqüência do clone C1-C2 tinha estabelecido que os cDNAs humano e porcino provenientes de nt 6565 até a extremidade 3' do domínio C1 eram idênticos. O produto de PCR foi clonado no sítio EcoRV de pBluescript II KS-. Quatro clones foram completamente seqüenciados em ambas as direções. Foi atingido um consenso em pelo menos 3 dos 4 sítios.

Isolamento de clones cDNA fVIII porcino contendo a metade 3' dos códons de domínio C2.

O domínio C2 de fVIII humano (nucleotídeos 6574-7053) está contido dentro dos éxons 24-26 [Gitschier J. e outros (1984) *Nature* **312**: 326-330]. O éxon 26 humano contém 1958 pb, nucleotídeos correspondentes 6901-8858. Ele inclui 1478 pb de seqüência 3' não traduzida. Falharam as tentativas para clonar o éxon 26 cDNA correspondente à extremidade 3' do domínio C2 e o 3'UTR por 3' RACE [Siebert e outros (1995) *supra*], inverse PCR [Ochman, H. e outros (1990) *Biotechnology (N.Y.)* **8**: 759-760], sítio de restrição PCR [Sarkar, G. e outros (1993) *PCR Meth. Appl.* **2**: 318-322],

"unpredictably primed" PCR [Dominguez, O. e outros (1994) *Nucleic. Acids Res.* 22: 3247-3248] e por seleção de uma coleção de cDNA de fígado porcino. Foi tentada 3' RACE usando-se a mesma coleção de cDNA de filamento duplo ligado a adaptador que foi usado para clonar com sucesso a extremidade 5' do cDNA de fVIII porcino. Assim, a falha deste método não foi em consequência da ausência de cDNA correspondente ao éxon 26.

Um procedimento gene direcionado em passagem em PCR [Parker, J.D. e outros (1991) *Nucleic. Acids. Res.* 19: 3055-3060] foi usado para clonar a metade 3' do domínio C2. Um iniciador sentido porcino-específico, SEQ ID Nº: 17 5'-TCAGGGCAATCAGGACTCC-3' (nt 6904-6924) foi sintetizado baseado na seqüência inicial do domínio C2 e foi usado em uma reação de PCR com iniciadores "ambulantes" não-específicos selecionados entre os oligonucleotídeos disponíveis no laboratório. Os produtos de PCR foram então direcionados por análise de extensão de iniciador [Parker e outros (1991) *BioTechniques* 10: 94-101] que usa um iniciador interno porcino-específico marcado com extremidade ³²P, SEQ ID Nº: 18 5'-CCGTGGTGAACGCTCTGGACC-3' (nt 6932-6952). Curiosamente, dos 40 iniciadores não-específicos testados, apenas dois forneceram produtos positivos em análise de extensão de iniciador e estes dois corresponderam a uma seqüência humana exata e degenerada na extremidade 3' do domínio C2: SEQ ID Nº: 19 5'-GTAGAGGTCCTGTGCCTCGCAGCC-3' (nt 7030-7053) e SEQ ID Nº: 20 5'-GTAGAGSTSCTGKGCCTCRCAKCCY AG-3', (nt 7027-7053). Estes iniciadores tinham sido inicialmente projetados para fornecer um produto por RT -PCR convencional porém falharam para fornecer produto suficiente que pudesse ser visualizado por ligação de corante com brometo de etídio. No entanto, um produto de PCR podia ser identificado pelo método mais sensível de diluição de iniciador. Este produto foi purificado em gel e seqüenciado diretamente. Isto estendeu a seqüência de fVIII porcino 3' até nt 7026.

Foi obtida seqüência adicional por análise de extensão de iniciador de um produto de PCR aninhado gerado usando-se a coleção de cDNA de filamento duplo ligado a adaptador usada no protocolo de 5'-RACE descrita

anteriormente. A primeira rodada da reação usou o iniciador exato porcino SEQ ID Nº 21 5'-CTTCGCATGGAGTTGATGGGCTGT-3' (nt 6541-6564) e o iniciador AP1. A segunda rodada da reação usou a SEQ ID Nº 22

5'-AATCAGGACTCCTCCACCCCCG-3' (nt 6913-6934) e o iniciador AP2. O seqüenciamento de PCR direta estendeu a seqüência 3' até a extremidade do domínio C2 (nt 7053). A seqüência do domínio C2 era única exceto em nt 7045 próximo à seqüência 3' do domínio C2. A análise de reações PCR repetidas forneceu A, G ou uma leitura dupla de A/G neste sítio.

O seqüenciamento foi estendido para o 3'UTR usando-se dois iniciadores adicionais, SEQ ID Nº 23

5'-GGA TCC ACC CCA CGA GCT GG-3' (nt 6977-6996) e SEQ ID Nº 24 5'-CGC CCT GAG GCT CGA GGT TCT AGG-3' (nt 7008-7031). Foram obtidos aproximadamente 15 pb de 3' UTR, embora a seqüência não estivesse clara em diversos sítios. Vários iniciadores anti-sentido foram então sintetizados baseados nas melhores estimativas da seqüência 3' não traduzida.

Estes iniciadores incluíam o complemento reverso do códon de interrupção TGA em seus terminais 3'. Foram obtidos produtos de PCR tanto de DNA genômico de baço porcino como de cDNA de baço porcino que foram visualizados por eletroforese em gel de agarose e brometo de etídio usando-se um iniciador sentido específico SEQ ID Nº: 25 5'-AAT CAG GAC TCC TCC ACC CCC G-3' (nt 6913-6934) o iniciador anti-sentido de 3' UTR, SEQ ID Nº: 26 5'-CCTTGCAGGAATTCGATTCA-3'. Para se obter quantidades suficientes de material para fins de clonagem, foi feita uma segunda rodada de PCR usando-se um iniciador sentido aninhado SEQ ID Nº: 27

5'-CCGTGGTGAACGCTCTGGACC-3' (nt 6932-6952) e o mesmo iniciador anti-sentido. O produto de PCR de 141 pb foi clonado em pBluescript II KS-cortado com EcoRV. A seqüência de três clones derivados de DNA genômico e de três clones derivados de cDNA foi obtida em ambas as direções. A seqüência era inambígua exceto a nt 7045, quando o DNA genômico sempre era A e o cDNA sempre era G.

Alinhamentos múltiplos de sequência de DNA de fVIII humano, porcino e de camundongo (Fig. 1A-1H).

Foram realizados alinhamentos do peptídeo sinal, regiões A1, A2, A3, C1 e C2 usando-se o programa CLUSTAL W [Thompson, J. D. e outros (1994) *Nucleic. Acids Res.* 22: 4673-4680]. As penalidades de espaço aberto e de extensão de espaço eram 10 e 0,5, respectivamente. Os alinhamentos dos domínios B humano, de camundongo e de porco foram descritos anteriormente [Elder e outros (1993) acima]. A sequência A2 humana corresponde aos aminoácidos 373-740 na SEQ ID Nº: 2. A sequência de aminoácido A2 porcina é fornecida na SEQ ID Nº: 4 e a sequência de aminoácido do domínio A2 de camundongo é fornecida na SEQ ID Nº: 28, aminoácidos 392-759.

Exemplo 6: Expressão de fator VIII porcino sem domínio B recombinante, ativo (PB⁺).

15 Materiais

Plasmas humanos de hemofilia A e normal citrados reunidos foram adquiridos de George King Biomedical, Inc. Soro fetal bovino, geneticina, penicilina, estreptomicina, meio DMEM/F12 e meio AIM-V foram adquiridos de Life Technologies, Inc. *Taq* DNA polimerase foi adquirida de Promega. *Vent* DNA polimerase foi adquirida de New England Biolabs. *Pfu* DNA polimerase e o fagomídio pBluescript II KS⁺ foram adquiridos de Stratagene. Os oligonucleotídeos sintéticos foram adquiridos de Life Technologies ou de Cruachem, Inc. As enzimas de restrição foram adquiridas de New England Biolabs ou de Promega. Foram usados iniciadores 5'-fosforilados quando os produtos de PCR foram produzidos para fins de clonagem. A numeração de nucleotídeo (nt) dos oligonucleotídeos usados como iniciadores para reação em cadeia de polimerase (PCR) amplificação de cDNA de fVIII porcino ou de DNA genômico usa o cDNA de fVIII humano como referência [Wood e outros (1984) *Nature* 312: 330-337]. Um vetor de expressão fVIII, designado HB⁺/ReNeo, foi obtido de Biogen, Inc. HB⁺/ReNeo contém genes de resistência à ampicilina e geneticina e um cDNA de fVIII humano onde falta o inteiro domínio B, definido como o fragmento de clivagem Ser741-Arg1648 produzido

v12

por trombina. Para simplificar a mutagênese do cDNA do domínio de fVIII C2, que está na extremidade 3' da inserção de fVIII em ReNeo, foi introduzido um sítio *NotI* duas bases 3' até o códon de interrupção de HB/ReNeo por junção por recobrimento de mutagênese de extensão (SOE) [Horton, R. M. e outros (1993) *Methods Enzymol.* 217: 270-279]. Este constructo é designado HB/ReNeo/*NotI*.

O RNA total foi isolado por extração com tiocianato ácido de guanidínio-fenol-clorofórmio [Chomczynski, P. e outros (1987) *Anal. Biochem.* 162: 156-159]. O cDNA foi sintetizado partindo de mRNA usando-se transcriptase reversa (RT) do vírus da leucemia murina de Moloney e hexâmeros em desordem de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (First-Strand cDNA Synthesis Kit, Pharmacia Biotech). O DNA de plasmídeo foi purificado usando-se um Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Inc.). Foram realizadas reações de PCR usando-se um termociclador Hybaid OmniGene que usa *Taq*, *Vent* ou *Pfu* DNA polimerases. Os produtos de PCR foram purificados em gel, precipitados com etanol e ligados em DNA de plasmídeo usando-se T4 DNA ligase (Rapid DNA ligation kit, Boehringer Mannheim). Os plasmídeos contendo inserção foram usados para transformar células Epicurian XL1-Blue de *E. coli*. Todas as novas seqüências de DNA de fVIII geradas por PCR foram confirmadas por seqüenciamento dideoxi que usa um seqüenciador automatizado de DNA 373a da Applied Biosystems e o kit terminador de corante PRISM.

Construção de um vetor de expressão de fVIII híbrido, HP20, que contém o domínio C2 porcino

Um cDNA de fVIII porcino correspondente à extremidade 3' do domínio C1 e todo o domínio C2 foi clonado em pBluescript por RT-PCR partindo de RNA total de baço usando-se iniciadores baseados em seqüência de cDNA de fVIII porcino conhecido [Healey, J.F. e outros (1996) *Blood* 88: 4209-4214]. Este constructo e HB/ReNeo foram usados como matrizes para construir um produto de fusão C1 humano-C2 porcino em pBluescript por mutagênese SOE. O fragmento C1-C2 neste plasmídeo foi removido com *Apal* e *NotI* e ligado em *Apal* / *NotI* –corte HB/ReNeo / *NotI* para produ-

zir HP20/ReNeo / *NotI*.

Construção de fVIII híbrido humano / porcino deletado em domínio B que contém (HP18) de cadeia leve porcino

A cadeia leve de fVIII humano consiste em resíduos de aminoácido Asp1649-Tyr2332. Os resíduos correspondentes no cDNA de fVIII porcino foram usados em lugar desta região de HB⁻ para produzir uma molécula de fVIII híbrido humano / porcino designada HP18. Isto foi feito por substituição de um produto de PCR correspondente à região A2 porcina, o domínio A3, o domínio C1 e parte do domínio C2 para a região correspondente em HP20. Para facilitar as construções, foi introduzido um sítio *AvrII* em nt 2273 na junção dos domínios A2 e A3 de HP20 por mutagênese SOE.

Construção de fVIII híbrido humano / porcino deletado em domínio B que contém o peptídeo sinal porcino, o domínio A1 e o domínio A2 (HP22)-

O peptídeo sinal de fVIII humano, o domínio A1 e os domínios A2 consistem em resíduos de aminoácido Met(-19)-Arg740. Os resíduos correspondentes no cDNA de fVIII porcino foram usados em lugar desta região de HB⁻ para produzir uma molécula designada HP22. Adicionalmente, foi introduzido um sítio *AavrII* sinônimo em nt 2273 na junção dos domínios A2 e A3 de HP22 por mutagênese SOE. O HP22 foi construído por fusão de um fragmento peptídeo sinal – A1- A2 parcial em pBlueScript [Healy e outros (1996) acima] com um fVIII híbrido humano / porcino sem domínio B que contém o domínio A2 porcino, designado HP1 (Lubin e outros (1994) acima).

Construção de fVIII porcino sem domínio B (PB⁻)

Um fragmento *SpeI* / *NotI* de HP18/BS (+*AvrII*) foi digerido com *AvrIII* / *NotI* e ligado em HP22/BS digerido com *AvrIII* / *NotI* (+*AvrII*) para produzir um constructo PB-/BS (+*AvrII*), que consiste no fVIII porcino em que falta o domínio B inteiro. PB⁻ foi clonado em ReNeo por ligação de um fragmento *XbaI* / *NotI* de PB⁻/BS (+*AvrII*) em HP22/ReNeo/*NotI* (+*AvrII*).

Expressão de moléculas de fVIII recombinante

PB⁻ /ReNeo/*NotI* (+*AvrII*) e HP22/ReNeo/*NotI* (+*AvrII*) foram transfectados transientemente em células COS e expressos como descrito anteriormente [Lubin, I.M. e outros (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 8639-8641].

HB⁻ /ReNeo/NotI e nenhum DNA (imitação) foram transfectados como um controle.

As atividades de fVIII de PB⁻, HP22 e HB⁻ foram medidas por um ensaio cromogênico como a seguir. As amostras de fVIII em sobrenadantes de cultura de célula foram ativadas por trombina 40 nM em NaCl 0,15 M, HEPES 20 mM, cAC12 5 mM, Tween-80 a 0,01%, pH 7,4 na presença de fator IXa 10 nM, fator X 425 nM e vesículas unilamelares 50 µM fosfatidilserina-[fosfatidilcolina (25/75 peso/peso). Após 5 minutos, a reação foi interrompida com EDTA 0,05 M e dessulfatohirudina recombinante 100 nM e o fator Xa resultante foi medido por dosagem de substrato cromogênico. No ensaio de substrato cromogênico, foi adicionado Spectrozyme 0,4 mM e a taxa de liberação de para-nitroanilida foi avaliada medindo-se a absorbância da solução a 405 nm.

Resultados de sobrenadantes de cultura de célula em duplicata transfectada (absorbância a 405 nm por minuto)

HB⁻: 13,9

PB⁻: 139

HP22: 100

Imitação: <0,2

Estes resultados indicam que o fVIII porcino sem domínio B e um fVIII sem domínio B que consiste nas subunidades A1 e A2 porcinas são ativos e sugerem que eles têm atividade superior a fVIII humano sem domínio B.

PB⁻ foi parcialmente purificado e concentrado partindo do meio de crescimento por cromatografia em heparina-Sepharose. Heparina-Sepharose (10 ml) foi equilibrada com NaCl 0,075 M, HEPES 10 mM, CaCl₂ 2,5 mM, Tween-80 a 0,005%, azida de sódio a 0,02%, pH 7,40. Foi aplicado meio (100-200 ml) proveniente de células de expressão a heparina-Sepharose, que então foi lavado com 30 ml de solução tamponadora de equilíbrio sem azida de sódio. PB⁻ foi eluído com NaCl 0,65 M, HEPES 20 mM, CaCl₂ 5 mM, Tween-80 a 0,01%, pH 7,40 e estocado a -80°C. O rendimento de atividade coagulante de fVIII foi tipicamente 50-75%.

Expressão estável de fVIII porcino sem domínio B (PB⁻)

Linhas de células transfectadas foram mantidas em meio de Eagle modificado de Dulbecco F12 que contém 10% de soro fetal bovino, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina. O soro fetal bovino foi inativado pelo calor a 50°C durante uma hora antes do uso. HB⁻ /ReNeo/NotI e PB⁻ /ReNeo/NotI (+AvrII) foram transfectados estavelmente em células BHK e selecionados para resistência a geneticina usando-se um protocolo geral que foi descrito anteriormente [Lubin, I.M. e outros (1994) *Biol. Chem.* **269**: 8639-8641] exceto que as células de expressão foram mantidas em meio de crescimento que contém 600 µg/ml de geneticina. As células dos frascos Corning T-75 crescidas a confluência foram transferidas para frascos triplos Nunc em meio que contém 600 µg/ml de geneticina e crescidas a confluência. O meio foi removido e substituído com meio AIM-V, isento de soro (Life Technologies, Inc.) sem geneticina. A expressão de fator VIII foi monitorada por atividade coagulante de fator VIII de uma etapa (ver acima) e 100-150 ml de meio foram coletados uma vez ao dia durante quatro a cinco dias. Os níveis de expressão máxima no meio para HB⁻ e PB⁻ foram 102 unidades por ml e 10-12 unidades por ml de atividade coagulante de fator VIII, respectivamente.

20 Purificação de PB⁻

O PB⁻ foi precipitado do sobrenadante da cultura usando-se sulfato de amônio saturado a 60% e então purificado por cromatografia W3-3 de imunoafinidade e cromatografia mono Q líquida a alta pressão como descrito anteriormente para a purificação de fator VIII porcino derivado de plasma [Lollar e outros (1993) *Factor VIII / factor VIIIa. Methods Enzymol.* **222**: 128-143].

A atividade coagulante específica de PB⁻ foi medida por um ensaio de coagulação em uma etapa [Lollar e outros (1993) acima] e era similar ao fator VIII porcino derivado de plasma.

30 Quando analisado por eletroforese em gel SDS-poliacrilamida, a preparação de PB⁻ continha três faixas de massas moleculares aparentes 160 kDa, 82 kDa e 76 kDa. As faixas de 82 kDa e 76 kDa foram descritas ante-

riormente como heterodímero que contém os domínios A1-A2 e ap-A3-C1-C2 (em que ap refere-se a um peptídeo de ativação) [Toole e outros (1984) *Nature* 312: 342-347]. A faixa de 160 kDa foi transferida para uma membrana de fluoreto de polivinilideno e sujeita a seqüenciamento NH₂-terminal, que forneceu Arg-Ile-Xx-Xx-Tyr (em que Xx representa enfraquecido) que é a seqüência NH₂-terminal de fator VIII de cadeia simples [Toole e outros (1984) acima]. Assim, PB⁺ é parcialmente processado por clivagem entre os domínios A2 e A3, tal que ele consiste em duas formas, uma cadeia simples proteína A1-A2-ap-A3-C1-C2 e um heterodímero A1-A2/ap-A3-C1-C2. Foi relatado processamento similar de HB⁺ recombinante [Lind e outros (1995) *Eur. J. Biochem.* 232: 19-27].

Caracterização de fator VIII Porcino

Foi determinada a seqüência de cDNA de fator VIII porcino correspondente a 137 pb do 5'UTR, a região de codificação de peptídeo sinal (57 pb) e os domínios A1 (1119 pb), A3 (990 pb), C1 (456 pb) e C2 (483 pb). Juntamente com a seqüência publicada anteriormente do domínio B e as regiões de peptídeo de ativação de cadeia leve [Toole e outros (1986) acima] e o domínio A2 [Lubin e outros (1994) acima], a seqüência relatada aqui completa a determinação do cDNA do fVIII porcino correspondente ao produto traduzido. Um fragmento que incluía a região 5' UTR, peptídeo sinal e cDNA do domínio A1 foi clonado usando-se um protocolo 5'-RACE RT-PCR. Um iniciador baseado na seqüência C2 humana foi bem sucedido na produção de um produto de RT-PCR que levou à clonagem do domínio A3, C1 e 5' metade do C2. O cDNA correspondente à metade 3' do domínio C2 e cDNA de 3' UTR provou ser difícil de ser clonado. O restante do domínio C2 definitivamente foi clonado por um procedimento de PCR ambulante de gene direcionado [Parker e outros (1991) acima].

A seqüência aqui relatada SEQ ID N° 29 era não ambígua exceto em nt 7045 próximo à extremidade 3' do domínio C2, que é A ou G como descrito aqui antes. O códon correspondente é GAC (Asp) ou AAC (Asn). Os códons humano e de camundongo são GAC e GAG (Gln), respectivamente. Desconhece-se se isto representa um polimorfismo ou um arte-

fato de PCR reproduzível. Os cDNAs de fVIII sem domínio B híbrido recombinante que contêm substituições de domínio C2 porcino correspondentes tanto aos códons GAC como AAC foram expressos estavelmente sem diferença detectável em atividade pró-coagulante. Isto indica que não há uma

5 diferença funcional entre estas duas variantes de domínio C2.

O alinhamento da seqüência de aminoácido prevista de fVIII porcino de comprimento total SEQ ID Nº 30 com as seqüências publicadas humana [Wood e outros (1984) acima] e murino (Elder e outros (1993) acima] é apresentado na Fig. 1A-1H juntamente com sítios para modificação

10 pós-translacional, clivagem proteolítica e reconhecimento por outras macromoléculas. O grau de identidade da seqüência alinhada é apresentado na Tabela VII. Como observado anteriormente, os domínios B destas espécies são mais divergentes do que os domínios A ou C. Isto é coerente com a observação de que o domínio B não tem função conhecida, apesar de seu grande

15 tamanho [Elder e outros (1993) acima; Toole e outros (1986) acima]. Os resultados da presente invenção confirmam que o domínio B de fVIII porcino não é necessário para atividade. Baseado nos dados da seqüência aqui apresentada, o fVIII porcino que tem toda ou parte do domínio B deletado pode ser sintetizado por expressão do DNA de codificação de fVIII porcino

20 que tem deletado do mesmo todos ou parte dos códons do domínio B porcino. Há também mais divergência de seqüências correspondentes ao domínio A1 APC / vetor IXa (resíduos 337-372) e o peptídeo de ativação de cadeia leve (Tabela VII). O sítio de clivagem de trombina na posição 336 para gerar o peptídeo 337-372 é aparentemente perdido no camundongo pois

25 este resíduo é glutamina em vez de arginina [Elder e outros (1993) acima]. A divergência relativamente rápida de peptídeos de clivagem de trombina (ou em fVIII de camundongo um peptídeo de ativação 337-372 possivelmente vestigial) foi observado anteriormente para os fibrinopeptídeos [Creighton, T. E. (1993) em Proteins: Structures and Molecular Properties, W.H. Freeman,

30 Nova York, pp. 105-138]. A falta de função biológica destes peptídeos uma vez clivados foi citada como uma possível razão para a rápida divergência. Arg562 em fVIII humano foi proposta como sendo o sítio de clivagem mais

importante para proteína C ativada durante a inativação de fVIII e fVIIIa (Fay, P.J. e outros (1991), *J. Biol. Chem.* 266: 20139-20145]. Este sítio é conservado em fVIII humano, porcino e de camundongo.

Os sítios de glicosilação N-ligados potenciais (NXS/T em que X não é prolina) podem ser observados na Fig. 1A-1H. Há oito sítios glicosilação N-ligados conservados: um no domínio A1, um no domínio A2, quatro no domínio B, um no domínio A3 e um no domínio C1. As cisteínas do domínio 19 A e C são conservadas, enquanto há divergência de cisteínas do domínio B. Seis das sete ligações de dissulfeto em fVIII são encontradas em sítios homólogos no fator V e ceruloplasmina e ambas as ligações de dissulfeto do domínio C são encontradas no fator V [McMullen, B.A. e outros (1995) *Protein Sci.* 4: 740-746]. O fVIII humano contém tirosinas sulfatadas nas posições 346, 718, 719, 723, 1664 e 1680 [Pittman, D.D. e outros (1992) *Biochemistry* 31: 3315-3325; Michnick, D.A. e outros (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 20095-20102]. Estes resíduos são conservados em fVIII de camundongo e em fVIII porcino (Fig. 1), embora o programa CLUSTALW falhasse em alinhar a tirosina de camundongo correspondente a Tyr346 em fVIII humano.

O plasma de camundongo e o de porco podem corrigir o defeito de coagulação em plasma de hemofilia A humana, o que é coerente com o nível de conservação de resíduos nos domínios A e C destas espécies. A atividade pró-coagulante de fVIII porcino é superior ao de fVIII humano [Lollar, P. e outros (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 23652-23657]. O fator VIII porcino recombinante (domínio B deletado) expresso e purificado como aqui descrito também apresenta maior atividade coagulante específica do que o fVIII humano, sendo comparável ao fVIII porcino derivado de plasma. Isto pode ser consequência de uma menor taxa de dissociação espontânea da subunidade A2 do heterotrímero fVIII ativo A1/A2/A3-C1-C2. Desconhece-se se esta diferença na atividade pró-coagulante reflete uma variação de evolução em função como um exemplo de adaptação da espécie [Perutz, M.F. (1996) *Adv. Protein Chem.* 36: 213-244]. Agora que a sequência de cDNA de fVIII porcino correspondente ao produto traduzido está completa, a mutagênese homóloga de varredura [Cunningham, B.C. e outros (1989) *Science* 243:

1330-1336] pode fornecer uma maneira de identificar diferenças estruturais entre fVIII humano e porcino que são responsáveis pela atividade superior deste último.

O fVIII porcino é tipicamente menos reativo com anticorpos inibidores que surgem em hemofílicos que receberam transfusão com fVIII ou que surgem como anticorpos na população geral. Esta é a base para se usar concentrado de fVIII porcino no tratamento de pacientes com anticorpos inibidores [Hay e Lozier (1995) acima]. A maior parte dos inibidores é dirigida contra epítomos localizados no domínio A2 ou no domínio C2 [Fulcher, C.A. e outros (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 7728-7732; Scandella, D. e outros (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 6152-6156; Scandella, D. e outros (1989) *Blood* 74: 1618-1626]. Adicionalmente, foi identificado um epítomo de significado desconhecido que está no domínio A3 ou C1 [Scandella e outros (1989) acima; Scandella, D. e outros (1993) *Blood* 82: 1767-1775; Nakai, H. e outros (1994) 84: 224a]. O epítomo A2 foi mapeado a resíduos 484-508 por mutagênese homóloga de varredura [Healey e outros (1995) acima]. Neste segmento de 25 resíduos, há uma proporção relativamente baixa de sequência idêntica (16/25 ou 64%). É interessante que esta região, que parece ser funcionalmente importante baseado no fato de que os anticorpos para esta são inibidores, aparentemente foi sujeito a um desvio genético relativamente mais rápido. O alinhamento do domínio A2 porcino e dos domínios A3 indicam que o epítomo A2 não compartilha homologia detectável com a região correspondente no domínio A3.

O epítomo inibidor C2 de fVIII humano foi proposto para estar localizado dentro dos resíduos 2248-2312 por mapeamento de deleção [Scandella, D. e outros (1995) *Blood* 86: 1811-1819]. fVIII humano e porcino são 83% idênticos neste segmento de 65 resíduos. No entanto, a mutagênese homóloga de varredura desta região para caracterizar o epítomo C2 revelou que um determinante principal do epítomo C2 estava inesperadamente localizado na região correspondente aos aminoácidos humanos 2181-2243 (SEQ ID Nº 2) e Fig. 1H.

Foram obtidas proteínas do fator VIII híbrido humano-porcino em



que várias porções do domínio C1 de fator VIII humano foram substituídas pelas porções correspondentes de fator VIII porcino, usando-se a estratégia aqui descrita. (Exemplo 5) A síntese dos vários fatores VIII C2-híbridos foi realizada por construção de DNA híbrido de revestimento, usando-se a sequência de nucleotídeo que codifica a região C2 porcina fornecida na SEQ ID N° 30. Cada DNA híbrido foi expresso em células transfectadas, tal que os fatores VIII híbridos podiam ser parcialmente purificados partindo do meio de crescimento. A atividade, na ausência de qualquer inibidor, foi medida pelo ensaio de coagulação em uma única etapa.

10 Foi usada uma bateria de cinco inibidores humanos para testar cada fator VIII híbrido. Os plasmas inibidores que contêm anticorpo de fator VIII foram apresentados anteriormente para serem dirigidos contra domínio C2 humano, baseado na capacidade de o domínio C2 humano recombinante neutralizar a inibição. Em todos os plasmas teste, o título de inibidor foi neutralizado mais do que 79% pelo domínio C2 ou cadeia leve porém menos do que 10% por domínio A2 humano recombinante. Além disso os fatores VIII C2-híbridos foram testados contra um anticorpo monoclonal murino, que se liga ao domínio C2 e anticorpos inibidores C2 humanos, ele inibia a ligação de fator VIII a fosfolípídeo e ao fator de von Willebrand.

20 Por comparação dos títulos de inibidor de anticorpo contra os fatores VIII C2-híbridos, foi demonstrado que o principal determinante do epítipo inibidor C2 humano é a região de resíduos 2181-2243 (SEQ ID N° 2, ver também Fig. 1H). Os anticorpos anti-C2 dirigidos a uma região COOH-terminal ao resíduo 2253 não foram identificados em quatro dos cinco soros de pacientes. Comparando-se os híbridos que têm sequência porcina correspondente a resíduos de aminoácido humano números 2181-2199 e 2207-2243, era evidente que ambas as regiões contribuem para a ligação do anticorpo. A sequência de aminoácido porcino correspondente aos resíduos humanos 2181-2243 é numerada 1982-2044 na SEQ ID N° 30. A sequência de DNA 25 porcino que codifica aminoácidos porcinos numerados 1982-2044 é a de 30 nucleotídeos numerados 5944-6132 na SEQ ID N° 29.

Com referência à Fig. 1H, pode ser observado que na região

2181-2243, há diferenças de 16 aminoácidos entre as seqüências humana e porcina. As diferenças são encontradas nos resíduos 2181, 2182, 2188, 2195-2197, 2199, 2207, 2216, 2222, 2224-2227, 2234, 2238 e 2243. A substituição de aminoácido em um ou mais destes resíduos numerados pode ser realizada para se obter um fator VIII humano modificado não reativo aos anticorpos inibidores anti-C2 humanos. A mutagênese de varredura da alanina fornece um método conveniente para gerar substituições de alanina para resíduos que ocorrem naturalmente, como descrito anteriormente. Os aminoácidos sem ser a alanina podem ser substituídos da mesma forma, como aqui descritos. As substituições de alanina para aminoácidos individuais, especialmente aqueles que não são idênticos entre humano / porcino ou humano / de camundongo ou que são mais prováveis de contribuir a ligação de anticorpo, pode fornecer um fator VIII modificado com reatividade reduzida a anticorpos inibidores.

As Figuras. 1A-1H consideradas juntas fornecem uma comparação de seqüência alinhada das seqüências de aminoácido do fator VIII humano, de porco e de camundongos. A Fig. 1A compara regiões de peptídeo sinal (humano, SEQ ID N° 31; porcino, SEQ ID N° 30, aminoácidos 1-19; murino, SEQ ID N° 28, aminoácidos 1-19). Observe-se que os aminoácidos na Fig. 1A-1H são numerados na primeira Alanina da proteína madura como número 1, com números negativos atribuídos aos aminoácidos do peptídeo sinal. A seqüência fator VIII humana na SEQ ID N° 2 também começa com a primeira Alanina da proteína madura como o aminoácido número 1. Nas seqüências de aminoácido de fVIII de camundongo (SEQ ID N° 28) e fVIII porcino (SEQ ID N° 30), o primeiro aminoácido (alanina) da seqüência madura é o aminoácido número 20. A Fig. 1A-1H apresenta um alinhamento das seqüências correspondentes de fVIII humano, de camundongo e de porco, tal que as regiões de maior identidade de aminoácido estão justapostas. Os números de aminoácido na Fig. 1A-1H se aplicam apenas a fVIII humano. A Fig. 1B fornece as seqüências de aminoácido para o domínio A1 de humano (SEQ ID N° 2, aminoácidos 1-372), porcino (SEQ ID N° 30, aminoácidos 20-391) e murino (SEQ ID N° 28, aminoácidos 20-391). A Fig. 1C fornece se-



qüências de aminoácido para os domínios A2 do Fator VIII de humano (SEQ ID Nº 2, aminoácidos 373-740), de porco (SEQ ID Nº 30, aminoácidos 392-859) e de camundongo (SEQ ID Nº 28, aminoácidos 392-759). A Fig. 1D fornece as seqüências de aminoácido de domínios B de fator VIII humano (SEQ ID Nº 2, aminoácidos 741-1648), de porco (SEQ ID Nº 30, aminoácidos 760-1449) e de camundongo (SEQ ID Nº 28, aminoácidos 760-1640). A Fig. 1E compara as seqüências de aminoácido de peptídeos de ativação de cadeia leve do Fator VIII de humano, de porco e de camundongo (SEQ ID Nº 2, aminoácidos 1649-1689; SEQ ID Nº 30, aminoácidos 1450-1490; e SEQ ID Nº 28, aminoácidos 1641-1678, respectivamente). A Fig. 1F fornece a comparação de seqüência para os domínios A3 do Fator VIII humano, de porco e de camundongo (SEQ ID Nº 2, aminoácidos 1690-2019; SEQ ID Nº 30, aminoácidos 1491-1820 e SEQ ID Nº 28, aminoácidos 1679-2006, respectivamente). A Fig. 1G fornece as seqüências de aminoácido dos domínios C1 de Fator VIII de humano, de porco e de camundongo (SEQ ID Nº 2, aminoácidos 2020-2172; SEQ ID Nº 30, aminoácidos 1821-1973 e SEQ ID Nº 28, aminoácidos 2007-2159, respectivamente) A Fig. 1H fornece dados de seqüência para os domínios C2 dos domínios C2 do Fator VIII de humano, de porco e de camundongo (SEQ ID Nº 2, aminoácidos 2173-2332; SEQ ID Nº 30, aminoácido 1974-2133 e SEQ ID Nº 28, aminoácidos 2160-2319, respectivamente).

Os diamantes representam sítios de sulfatação de tirosina, sítios de ligação propostos para o Fator IXa, fosfolipídeo e Proteína C estão em sublinhado duplo e as regiões envolvidas na ligação de anticorpos inibidores anti-A2 e anti-C2 estão em itálico. Os asteriscos ressaltam as seqüências de aminoácido que são conservadas. Ver também SEQ ID Nº 29 (cDNA do fator VIII porcino) e SEQ ID Nº 30 (seqüência de aminoácido deduzida de fator VIII porcino). O sistema de numeração humano é usado como a referência [Wood e outros (1984) acima]. Os domínios A1, A2 e B são definidos por sítios de clivagem de trombina nas posições 372 e 740 e um sítio de clivagem de protease desconhecido em 1648 como resíduos 1-372, 373-740 e 741-1648, respectivamente [Eaton, D.L. e outros (1986) *Biochemistry* 25:

8343-8347]. Os domínios A3, C1 e C2 estão definidos nos resíduos 1690-2019, 2020-2172 e 2173-2332, respectivamente [Vehar e outros (1984) acima]. Os sítios de clivagem para trombina (fator IIa), fator IXa, fator Xa e APC [Fay e outros (1991) acima; Eaton, D. e outros (1986) *Biochemistry* **25**: 505-512; Lamphear, B.J. e outros (1992) *Blood* **80**: 3120-3128] são apresentados colocando-se o nome da enzima sobre o resíduo arginina. Um peptídeo ácido é clivado da cadeia leve de fVIII por trombina ou fator a na posição 1689. Os sítios de ligação propostos para o Fator IXa [Fay, P.J. e outros (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 20522-20527; Lenting, P.J. e outros (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 7150-7155), fosfolipídio (Foster, P.A. e outros (1990) *Blood* **75**: 1999-2004) e proteína C (Walker, F.J. e outros (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 1484-1489] estão duplamente sublinhados. As regiões envolvidas no anti-A2 de ligação [Lubin e outros (1994) acima; Healey e outros (1995) acima]; e propostas anteriormente para anticorpos inibidores anti-C2 estão em *itálico*. O epítopo inibidor C2 identificado como aqui descrito (aminoácidos humanos 2181-2243) é apresentado por um sublinhado simples na Fig. 1H. Os sítios de sulfatação de tirosina [Pittman e outros (1992) acima; Michnick e outros (1994) acima] são apresentados por ♦.

Exemplo 7: Construção de POLI212 e Expressão em Células de Rim de Bebê Hamster.

O POLI212 é um fator VIII porcino parcialmente sem domínio B, que tem o domínio B deletado exceto que os 12 aminoácidos do terminal NH₂ do domínio B e 12 aminoácidos do terminal -COOH são mantidos.

Os cDNAs que codificam para as seqüências para os domínios fVIII porcino A1, A2, ap-A3-C1 e C2 foram obtidos como descrito no Exemplo 5. A seqüência de nucleotídeo de DNA e a seqüência de aminoácido derivada de fator VIII porcino são apresentadas como SEQ ID N° 29 e SEQ ID N° 30, respectivamente. Os fragmentos amplificados foram clonados separadamente no plasmídeo no pBluescript II KS⁻ (pBS).

O POLI212 refere-se ao cDNA que codifica fVIII porcino em que falta a maior parte do domínio B porém que contém a seqüência de DNA que codifica um linker com 24 aminoácidos entre o domínios A2 e ap. O POLI212



foi construído em um vetor de expressão de mamíferos, ReNeo, que foi obtido de Biogen. O ReNeo pode replicar-se em bactérias, replicar-se como um epissoma em células COS para expressão transiente de fator VIII ou estar integrado estavelmente em uma variedade de células de mamíferos. Ele consiste em 1) seqüências derivadas do plasmídeo pBR322 que incluem uma origem de replicação e o gene de resistência a ampicilina, 2) um gene de resistência a neomicina cuja expressão está sob o controle do promotor / intensificador SV40, pequeno íntron t SV40 e os elementos reguladores de sinal de poliadenilação de SV40, 3) um sítio para inserção de fVIII e seu peptídeo sinal, cuja expressão está sob o controle do intensificador SV40, promotor tardio principal do tipo 2 de adenovírus e seqüência líder tripartida do tipo 2 de adenovírus. Qualquer vetor que tenha componentes funcionais similares pode ser usada em lugar do vetor ReNeo.

POLI212 / ReNeo foi preparado em diversas etapas. Primeiro, os cDNAs que codificam para a cadeia pesada de fVIII porcino (A1-A2) e os cDNAs que codificam para a cadeia leve de fVIII porcino (*ap*-A3-C1-C2) foram reunidos separadamente em pBS. Partindo destas construções, o DNA que codifica para o fVIII porcino sem domínio B foi reunido em pBS (PB-/pBS). Nesta forma de fator VIII porcino falta o inteiro domínio B, definido como aminoácidos correspondentes aos resíduos 741 - 1648 em fVIII humano (nucleotídeos humanos 2278 - 5001). A seguir, o DNA que codifica para A2 porcino foi usado em lugar do domínio A2 humano no vetor de expressão de fVIII humano sem domínio B ReNeo (HB-/ReNeo). O DNA que codifica o restante da cadeia pesada porcina e o DNA que codifica a cadeia leve porcina foram usados em lugar dos domínios humanos em duas etapas adicionais que usam as construções cadeia pesada porcina / pBS e PB-/pBS obtidas anteriormente. Um fragmento do domínio B humano que codifica os aminoácidos 5 C-terminal e 9 N-terminal foi inserido entre os domínios A2 e A3 produzindo uma construção chamada PSQ/ReNeo [Healey et al. (1998) 92: 3701-3709]. Os resíduos Glu2181-Val2243 contêm um determinante principal do epítipo inibidor no domínio C2 de fator VIII humano). Esta construção foi usada como uma matriz para se obter um fragmento do domínio B porcino que codifica para

2998-3021 da SEQ ID Nº 29. A sequência é 5'-GGTCACTTGTCTACCGTGAGCAGC -3' (ver SEQ ID Nº 29)

Iniciador interno: OL12+, um iniciador porcino que abrange os últimos (3') 16 aminoácidos de OL1212 e os primeiros (5') 6 aminoácido do peptídeo de ativação, nucleotídeo 2302-2367 da SEQ ID Nº 29. A sequência é:
5'-CCTAGTGCGAGCGCTCCAAAGCCTCCGGTCTCGGACGGCATCAGAGGGACATA
AGCCTTCCTACT-3' (SEQ ID Nº 36)

Matriz: PSQ/ReNeo

Produto: porcino proveniente do nucleotídeo 2302 em OL1212 até o nucleotídeo 3021 no domínio A3, 719 pb

Reação SOE

Iniciadores: Rev 4, P2949-

Matrizes: Fragmento proveniente de reação nº 1 (pb) e fragmento de baixo ponto de fusão proveniente da reação nº 2 (pb)

Produto: DNA porcino proveniente do nucleotídeo 1742 no domínio A2 até o nucleotídeo 3021 no domínio A3 (SEQ ID Nº 29) que inclui OL1212, 1279 pb. O produto da reação foi precipitado em etanol.

O linker 1212 foi inserido em PSQ/ReNeo por corte do produto de SOE (inserção) e PSQ/ReNeo (vetor) com *BsaB* I. O vetor e a inserção foram ligados usando-se T4 ligase e o produto foi usado para transformar células XL1-Blue de *E. coli*. Foi preparado DNA de plasmídeo partindo de diversas colônias e a sequência do linker 1212 e outra sequência gerada em PCR foi verificada por análise de sequência de DNA.

Cultura de Células de Rim de Bebê Hamster (BHK) CRL-1632

Uma linhagem de célula BHK foi obtida da ATCC, identificação de acesso CRL-1632 e foi estocada congelada a -20°C até uso posterior. As células foram descongeladas a 37°C e colocadas em 10 ml de meio completo, definido como DMEM / F12, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina mais soro fetal bovino (FBS) a 10%. O FBS foi adquirido de Hyclone, Logan Utah. As células foram centrifugadas durante 2 minutos a 300 RPM. O meio foi aspirado e as células foram ressuspensas em dois ml de meio completo em um frasco T-75 que contém 20 ml de meio completo.

POL1212 foi expresso tanto em células de rim de bebê hamster (BHK) como em células de ovário de hamster chinesa (CHO). Foram usadas duas linhagens BHK, a linhagem CRL-1632 proveniente de ATCC e uma outra linhagem BHK obtida por R. McGillivray, University of British Columbia, [Funk e outros (1990) *Biochemistry* **29**: 1654-1660]. Esta última foi subcultivada sem seleção no laboratório dos inventores e designada BHK1632 (Emory). A linhagem de célula CHO era CHO-K1, ATCC acesso CCL-61. A expressão do clone médio proveniente da linhagem de célula Emory e de células CHO-K1, ATCC era uma pouco mais alta do que proveniente de células CRL-1632 como julgado por atividade de ensaio cromogênico.

As células cultivadas no frasco T-75 formavam uma monocamada confluenta. Foi preparada uma cultura de 60 ml de células XL1-Blue de *E. coli* em LB / ampicilina (50 mg/ml) contendo o plasmídeo POL1212/ReNeo.

Transfecção de Células CRL-1632 BHK com POL1212/ReNeo

DNA proveniente de cultura deixada durante toda a noite das células POL1212/ReNeo XL1-Blue foram preparadas usando-se um Spin Miniprep kit de Qiagen, Valencia. Um frasco de células CRL-1632 foi dividido em um frasco de estoque com 0,2 ml e um frasco para transfecção com 0,3 ml do total de 2 ml. O outro frasco foi alimentado com meio novo. O meio era DMEM/F12 + 10% de Hyclone FBS + 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina. As células CRL-1632 foram divididas em placas de 6 cavidades com o objetivo de 50-90% de confluência para transfecção (0,3 ml de células provenientes do frasco T-75 em 2 ml de Versene 1:5000 [Life Technologies, Gaithersburg, MD] em cada cavidade) usando DMEM/F12 novo + 10% de Hyclone FBS + 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina.

As soluções a seguir foram preparadas em tubos de ensaio estéreis de 1-2 ml;

A) 48 µl (10 µg) de Miniprep POL1212/ReNeo DNA mais µl de meio sem soro (DMEM/F12) mais 10 µL de LipofectinTM (Life Technologies, Gaithersburg, MD).

B) 10 µL de Lipofectin mais 190 µl de meio (imitação de transfecção) foram misturados cuidadosamente e o DNA e a Lipofectin deixados



reagir durante 15 minutos à temperatura ambiente. Durante este período de tempo, as células foram lavadas duas vezes com 2 ml de DMEM/F12. 1,8 ml de DMEM/F12 foi então adicionado às células. O complexo de DNA/ Lipofectin foi adicionado gota a gota às células e girado cuidadosamente para
5 efetuar a misturação. As células permaneceram na incubadora durante toda a noite. Removeu-se o DNA/ Lipofectin e adicionaram-se 3 ml de meio com soro às células. As células foram incubadas durante 30 – 48 horas. Geneticina foi adquirida de Life Technologies, Gaithersburg, MD). As culturas de célula foram divididas 1:20, 1:50 e 1:100, 1:250, 1:500 sobre placas em 10 ml
10 de meio com soro contendo 535 µg/ml de geneticina. Durante os próximos vários dias, as células que não captaram o plasmídeo POL1212/ReNeo foram mortas em virtude da presença de geneticina. As células restantes continuaram a se replicar em geneticina, formando colônias em monocamada visíveis sobre as placas.

15 Expressão de Dosagem de POL1212 Partindo de Células CRL-1632 BEK

Foram colocados pequenos anéis cilíndricos de plástico ao redor das colônias. As colônias foram aspiradas separadamente usando-se meio completo e transferidas para tubos de ensaio. Estas colônias são denominadas colônias clonadas em anel. As colônias clonadas em anel foram aplica-
20 das separadamente sobre placas de 24 cavidades e deixadas crescer em meio completo.

Ensaio de Substrato Cromogênico para Expressão de Fator VIII por Células CRL-1632 Transfectadas

Amostras de POL1212 proveniente de sobrenadantes de cultura
25 de célula foram misturadas com fator IXa porcino purificado 50 nM e vesículas de fosfatidilcolina / fosfatidilserina (PCPS) 0,05 mM em NaCl 0,15 M, Hepes 20 mM, CaCl₂ 5 mM, Tween 80 a 0,01%, pH 7,4. Como um controle, foi usado meio de cultura de célula proveniente de células transfectadas-imitação. Foram adicionados trombina e fator X simultaneamente até concentrações fi-
30 nais de 40 e 425 nM, respectivamente. A trombina ativa o fator VIII, que então, juntamente com PCPS, serve como um co-fator para o fator IXa durante a ativação do fator X.



Após 5 minutos, a ativação do fator X pelo fator IXa/fator VIIIa/PCPS foi interrompida pela adição de EDTA até uma concentração final de 50 mM. Ao mesmo tempo a ativação do fator VIII por trombina foi interrompida pela adição do inibidor de trombina, dessulfatohirudina recombinante, até uma concentração final de 100 nM. Uma amostra de 25 µl da mistura da reação foi transferida para uma cavidade de microtítulo, à qual foram adicionados 74 µl de Spectrozyme Xa (America Diagnostica, Greenwich, CT), que é um substrato cromogênico para o fator Xa. A concentração final de Spectrozyme Xa era 0,6 mM. A absorbância a 405 nm em consequência da clivagem de Spectrozyme Xa pelo fator Xa foi monitorada continuamente durante 5 minutos com uma V_{max} Kinetic Plate Reader (Molecular Devices, Inc., Menlo park, CA). Os resultados são expressos em termos de A₄₀₅/minuto.

Ensaio cromogênico de fator VIII de dez colônias clonadas em anel:

Número da colônia	A ₄₀₅ /minuto (x 10 ³)
Tampão	0,2
1	2,1
2	8,4
3	6,4
4	10,7
5	12,5
6	7,6
7	51,3
8	139,5
9	3,8
10	8,4

Estes resultados demonstram que todas as dez colônias que foram selecionadas expressam a atividade do fator VIII que é pelo menos dez vezes maior do que o valor base.

A atividade proveniente do meio da colônia 8, que era a colônia de mais alta expressão, foi também examinada pelo ensaio de coagulação de fator VIII de um estado. Neste ensaio, 50 ml de plasma deficiente em fator VIII (George King Biomedical Overland Park, KA), 50 ml de amostra ou

- de padrão e 50 ml de reagente de tempo de tromboplastina particulada ativada (Organon Teknika, Durham, NC) foram incubados durante 3 minutos a 37°C. As amostras incluem meio 8 para colônia diluído em NaCl 0,15 M, Hepes mM, pH 7,4 (HBS) ou, como um controle, meio completo. A coagulação foi iniciada por adição de 50 ml de CaCl_2 20 mM. O tempo de coagulação foi medido usando-se um ST4 BIO Coagulation Instrument (Diagnostic Stago, Parsippany, NJ). Foi obtida uma curva padrão fazendo-se diluições de plasma humano normal citrado reunido, lote 0641 (George King Biomedical Overland Park, KA). A concentração de fator VIII do padrão era 0,9 unidade / ml.

Curva padrão:

	<u>Diluição</u>	<u>U/ml</u>	<u>Tempo de coagulação</u>
1)	Não diluído	0,96	45,2
2)	1/3 (HBS)	0,32	53,7
3)	1/11 (HBS)	0,087	62,5
4)	1/21 (HBS)	0,046	68,9

- 10 A regressão linear do tempo de coagulação versus o logaritmo da concentração de padrão forneceu um coeficiente de correlação de 0,997.

As substâncias teste forneceram os tempos de coagulação a seguir, que foram convertidos em unidades por ml usando-se a curva padrão:

<u>Amostra</u>	<u>Tempo de coagulação</u> <u>(segundos)</u>	<u>Unidades /ml</u>
1) Colônia 8 (24 h) 1/10 em HBS	40,6	$1,74 \times 10 = 17,4$
2) Colônia 8 (24 h) 1/10 em HBS	41,1	$1,63 \times 10 = 16,3$
3) Colônia 8 (24 h) 1/20 em HBS	47,7	$0,69 \times 20 = 13,8$
4) Colônia 8 (24 h) 1/20 em HBS	47,2	$0,73 \times 20 = 14,6$
5) Meio completo	82,9	0,007
6) Meio completo	83,3	0,006

- 15 Estes resultados demonstram que a atividade de coagulação da colônia 8 é aproximadamente 2000 vezes maior do que a amostra de controle.

A sequência de DNA que codifica POL1212 é apresentada como SEQ ID N° 37. A sequência de aminoácido codificada de POL1212 é apresentada como SEQ ID N° 38. A purificação adicional de POL1212 pode ser realizada usando-se uma variedade de métodos conhecidos tais como cromatografia por imunoafinidade e cromatografia HPLC – ver Exemplos 2 e 3.

Observações Conclusivas Gerais

Será entendido que podem ser introduzidas variações mínimas de sequência de aminoácido ou o DNA que codifica tal sequência referente a POL1212 pode ser introduzido sem afetar os atributos essenciais de função.

- 10 Por exemplo, o comprimento da sequência de domínio B mantido como um linker / entre o domínio A2 e o peptídeo de ativação pode ser aumentado ou diminuído dentro de limites conhecidos na técnica. Podem ser introduzidas variantes de sequência na região do linker enquanto se mantêm os atributos funcionais equivalentes de POL1212 como ensinado neste caso e de fator
- 15 VIII sem domínio B porcino como ensinado neste caso e como conhecido na técnica. Baseado em comparações de sequências de aminoácido de fator VIII conhecido que têm atividade coagulante em sangue humano, podem ser obtidas variantes de sequência tais como substituições individuais de aminoácido ou substituição de segmentos de peptídeo com variantes funcionais
- 20 conhecidas na sequência de aminoácido POL1212 básica, enquanto se mantêm os atributos funcionais equivalentes da mesma. Não se pretende que os tipos anteriores de variação estejam completos, porém são simplesmente exemplos das modificações de sequência que podiam ser feitas pelos versados na técnica, sem modificar substancialmente os atributos funcionais
- 25 da proteína. Considera-se que todas tais variantes e modificações se situam no âmbito da invenção como reivindicado ou como equivalentes da mesma.

Listagem de ID de sequência:

<u>SEQ ID N°:</u>	<u>Identificação</u>
1	cDNA de fator VIII humano. Codificação para número 1 de aminoácido da proteína madura começa no nucleotídeo número 208.
2	Sequência de aminoácido de fator VIII humano

61
01

- 3 cDNA do domínio A2 do fator VIII porcino
- 4 Seqüência de aminoácido de domínio A2 de fator VIII porcino
- 5 a 27 Iniciador oligonucleotídeo seq. (Exemplo 5)
- 5 28 Seqüência de aminoácido de fator VIII murino
- 29 cDNA de fator VIII porcino
- 30 Seqüência de aminoácido de fator VIII porcino
- 31 Seqüência de aminoácido de peptídeo sinal de fator VIII humano
- 10 32 a 36 Iniciador oligonucleotídeo (Exemplo 7)
- 37 POL1212 que codifica DNA
- 38 Seqüência de aminoácido de POL1212

REIVINDICAÇÕES

1. DNA, caracterizado pelo fato de ser um DNA codificador da sequência de aminoácido de POL1212 como apresentado na SEQ ID Nº 38.

2. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compre-
5 ende um DNA como definido na reivindicação 1.

3. DNA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que apresenta a sequência de nucleotídeo de SEQ ID Nº 37.

4. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compre-
ende um DNA como definido na reivindicação 3.

10 5. Fator VIII de porcino modificado, caracterizado pelo fato de que apresenta a sequência de aminoácido de SEQ ID Nº 38.

6. Composição terapêutica, caracterizada pelo fato de que com-
preende um fator VIII de porcino modificado, como definido na reivindicação
5, e um veículo fisiologicamente aceitável.

15 7. Processo para produção de uma proteína fator VIII de porcino modificado apresentando a sequência de aminoácido da SEQ ID Nº 38, ca-
racterizado pelo fato de que compreende expressar em uma célula hospedeira de mamífero um DNA que codifica a sequência de aminoácido da SEQ
ID Nº 38.

20 8. Processo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o DNA que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID Nº
38 também codifica um peptídeo de sinal, sendo que a proteína fator VIII de porcino modificado é exportada da célula hospedeira de mamífero.

25 9. Processo, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o peptídeo sinal apresenta a sequência de aminoácidos 1 a 19 da SEQ ID Nº 30.



Peptideo Sinal

Humano -19 MQIELSTCFF LCLLRFCS
 Porco MQLELSTCVF LCLLPLGFS
 Camundongo MQIALFACFF LSLFNCSS
 ** * * * * *

FIG. 1A

Dominio A1

Humano 1 ATRFYLLGAV ELSWDYMQSD LG-ELPVDAR FPPRVPKSFP FNTSVVYKKT
 Porco AIRRYLLGAV ELSWDYRQSE LLRELHVDTR FPATAPGALP LGPSVLYKKT
 Camundongo AIRRYLLGAV ELSWNYIQSD LLSVLHTDSR FLPRMSTSFP FNTSIMYKKT
 ***** * * * * *

FIG. 1B

50 LFVEFTDHLF NIAKPRPPWM GLLGPTIQAE VYDTVITLK NMASHPVSLH
 VFVEFTDQLF SVARPRPPWM GLLGPTIQAE VYDTVVTLK NMASHPVSLH
 VFVEYKDQLF NIAKPRPPWM GLLGPTIWE VHDTVITLK NMASHPVSLH
 *** * * * * *

100 AVGVSYWKAS EGAEYDDQTS QREKEDDKVF PGGSHTYVWQ VLKENGPMAS
 AVGVSFWKSS EGAEYEDHTS QREKEDDKVL PGKSQTYVWQ VLKENGPTAS
 AVGVSYWKAS EGDEYEDQTS QMEKEDDKVF PGESHTYVWQ VLKENGPMAS
 ***** * * * * *

150 DPLCLTYSYL SHVDLVKDLN SGLIGALLVC REGSLAKEKT QTLHKFILLF
 DPPCLTYSYL SHVDLVKDLN SGLIGALLVC REGSLTRERT QNLHEFVLLF
 DPPCLTYSYM SHVDLVKDLN SGLIGALLVC KEGSLSKERT QMLYQFVLLF
 ***** * * * * *

200 AVFDEGKSWH SETKNSLMQD RDAASARAWP KMHTVNGYVN RSLPGLIGCH
 AVFDEGKSWH SARNSWTRA MDPAPARAQP AMHTVNGYVN RSLPGLIGCH
 AVFDEGKSWH SETNDSYTQS MDSASARDWP KMHTVNGYVN RSLPGLIGCH
 ***** * * * * *

250 RKSVMYWHVIG MGTTPPEVHSI FLEGHTFLVR NHRQASLEIS PITFLTAQTL
 KKSVMYWHVIG MGTSPEVHSI FLEGHTFLVR HHRQASLEIS PLTFLTAQTF
 RKSVMYWHVIG MGTTPPEIHSI FLEGHTFFVR NHRQASLEIS PITFLTAQTL
 ***** * * * * *

APC/IXa

300 LMDLGQFLLF CHISSHQHDG MEAYVKVDSC PEEPQLRMKN NEEAEDYDDO
 LMDLGQFLLF CHISSHHGG MEAHVRVESC AEPPQLRRKA DE-EEDYDDN
 LIDLQFLLF CHISSKHGD MEAYVKVDSC PEESQWQKKNN NN-EEMEDYO
 * * * * *

IIa/Xa

350 LTDSEMDVVR FDDDNPSFI QIR
 LYDSMDVVR LDGDDVSPFI QIR
 DOLYSEMDMF TLDYDSSPFI QIR
 ** **

13/1

Domínio A2

Humano 373 SVAKKHPKTW VHYIAAEEED WDYAPLV LAP DRSYKSQYL NNGPQRIGRK
 Porco SVAKKHPKTW VHYISAAEEED WDYAPAVPSP SDRSYKSLYL NSGPQRIGRK
 Camundongo SVAKKYPKTW IHYISAAEEED WDYAPSVPTS DNGSYKSQYL SNGPHRIGRK
 ***** **

FIG. 1C

423 YKKVRFMAYT DETFKTREAI QHESGILGPL LYGEVGD TLL IIFKNQASRP
 YKKARFVAYT DVTFKTRKAI PYESGILGPL LYGEVGD TLL IIFKNKASRP
 YKKVRFIAYT DETFKTRETI QHESGLLGPL LYGEVGD TLL IIFKNQASRP
 *** ** *** * ***** *

Epitopo de inibidor de AZ

473 YNIYPHGITD VRPLYSRRLP KGVKHLKDFP ILPGEIFKYK WTVTVEDGPT
 YNIYPHGITD VSALHPGRL KGWKHLKDMP ILPGETFKYK WTVTVEDGPT
 YNIYPHGITD VSPLHARRLP RGIKHVKDLP IHPGEIFKYK WTVTVEDGPT
 ***** * * * ** ** * * *

Ligação de F.IXa

APC

523 KSDPRCLTRY YSSFVNMERD LASGLIGPLL ICYKESVDQR GNOIMSDKRN
 KSDPRCLTRY YSSSINLEKD LASGLIGPLL ICYKESVDQR GNQMMSDKRN
 KSDPRCLTRY YSSFINPERD LASGLIGPLL ICYKESVDQR GNQMMSDKRN
 ***** *** * * *

573 VILFSVFDEN RSWYLTENIQ RFLPNPAGVQ LEDPEFQASN IMHSINGYVF
 VILFSVFDEN QSWYLAENIQ RFLPNPDGLQ PQDPEFQASN IMHSINGYVF
 VILFSIFDEN QSWYITENMQ RFI PNAKTQ PQDPGFQASN IMHSINGYVF
 ***** *** ** * ** ** *

623 DSLQLSVCLH EVAYWYILSI GAQTDFLSVF FSGYTFKHKM VYEDTLTLFP
 DSLQLSVCLH EVAYWYILSV GAQTDFLSVF FSGYTFKHKM VYEDTLTLFP
 DSLELTVCLH EVAYWHILSV GAQTDFLSIF FSGYTFKHKM VYEDTLTLFP
 *** * ***** ***** **

673 FSGETVFMSM ENPGLWILGC HNSDFRNRGM TALLKVSSCD KNTGDYYEDS
 FSGETVFMSM ENPGLWVLGC HNSDLNRGM TALLKVYSCD RDIGDYYDNT
 FSGETVFMSM ENPGLWVLGC HNSDFRKRGM TALLKVSSCD KSTDYEEI
 ***** ***** * * *

IIa/Xa/APC

723 YEDISAYLLS KNNAI EPR
 YEDIPGFLLS GKNVIEPR
 YEDIPTQLVN ENNVIOPR
 ***** *

133

Dominio B

Humano 741 SFSQNSRHPS TRQKQFNATT IPENDIEKTD PWFHARTPMP KIQNVSSSDL
 Porco SFAQNSRPPS ASQKQFQTIT SPEDDVE-LD PQSGERTQAL EELSVPSSGDG
 Camundongo SFFQNTNHPN TRKKKFKDST IPKNDMEKIE PQFEEIAEML KVQSVSVSDM
 ** ** * * * * *

FIG. 1D

791 LMLLRQS-PT PHGLSLSDLQ EAKYETFSDD PSPGAIDSNN SLSEMTFRP
 SMLLGQN-PA PHGSSSSDLQ EARNEA--DD YLPGARERNT APSAAARLRP
 LMLLGQSHPT PHGLFLSDGQ EAIYEAIHDD HSPNAIDSNE GPSKVTQLRP
 *** * *** * * * * * * * *

840 QLHHSGOMVF TPESGLQLRL NEKLGTTAAT ELKKLDFKVS ST-SNNLIS-
 ELHHSARVL TPEP----- -----EK ELKKLDSKMS SSSDLLKTSP
 ESHHSEKIVF TPQGLQLRS NKSLETTIEV KWKKLGLQVS SLPSNLMTT-
 *** * ** *** * *

888 TIPSDNLAAGT DNTSSLGPPS MPVHYDSQLD TTLFGKKSSP LTESGGPLSL
 TIPSDTLAET ERTSLGPPH PQVNFRSQLG AIVLGKNSSH FIGAGVPLGS
 TILSDNLKATF EKTDSGGFPD MPVHSSSKLS TTAFGKKAYS LVGSHVPLNA
 ** * * * * * * * * * *

939 SEENNSDKLL ESGLMNSQES SWGKNVSSTE SGRLFKGKRA HGPALLTKDN
 TEED----- -----HES SLGENVSPVE SDGIFEKERA HGPASLTKDD
 SEENSOSNIL DSTLMYSQES LPRONILSIE NDRLLREKRF HGIALLTKN
 ** ** * * * * *

989 ALFKVISISLL KTNKTSNNSA TNRKTHIDGP SLLIENSPSV WQNILESOTE
 VLFKVNISLV KTNKARVYLK TNRKIHIDDA ALLTENRAS- -----
 TLFKDNVSLM KTNKTYNHST TNEKLHTESP TSIENSTTDL QDAILKVNSE
 *** ** **** ** * *

1039 FKKVTPLIHD RMLMDKNATA LRLNHMSNKT TSSKNMEMVQ QKKEGPIPPD
 -----ATFMDKNNTA SGLNHVSN-- -----
 IQEVTALIHD GTLLGKNSTY LRLNHMLNRT TSTKNKDIFH RKQEDPIPPQ
 * *** ** *** *

1089 AQNPDSFFK MLFLPESARW IQRTHGKNSL NSGQGPSPKQ LVSLGPEKSV
 -----W IKGPLGKNPL SSERGPSPEL LTSSGSGKSV
 EENTIMPFSK MLFLSESSNW FKKTNGNNSL NSEQEHSPKQ LVYLMFKKYV
 * * * * *

1139 EGQNFLSEKN KVVVGKGEFT KDVGLKEMVF PSSRNFLFTN LDNLHENNTH
 KGQSSGQGRV RVAVEEEELS KG---KEMML PNSELTFTN SADVQGNTH
 KNQSFLEKN KVTVEQDGFT KNIGLKDMAF PHNMSIFLTT LSNVHENGHR
 * * * * *

1189 NQEKKIQEEI EKKETLIQEN VVLPQIHTVT GTKNFMKNLF LLSTRQNVEG
 SQGKSREEM ERREKLVEK VDLPPQVYTAT GTKNFLRNIF HQSTEPSVEG
 NQEKNIQEEI EK-EALIEEK VVLPQVHEAT GSKNFLKDIL ILGTRQNI--
 * * * * *

1239 SYDGAYAPVL QDFRSLNDST NRTKKHTAHF SK--KGEEN LEGLGNQTKQ
 FDGGSHAPVP QDSRSLNDSA ERAETHIAHF SAIR--EEAP LEAPGNRT..
 SLYEVHVPVL QNITSINNST NTVQIHMEHF FKRRKDKETN SEGLVNKTRE
 ** * * * * * * *



Peptídeo de ativação de cadeia leve

Humano 1649 EITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR I Ia/Xa
 Porco DISLPTTFQPEEDKMDYDDIFSTETKGEDFDIYGEDENQDPR
 Camundongo EL--SAFQSEQATDYDDAITIET-IEDFDIYSEDIKQGR
 * * * * *

FIG. 1E

Dominio A3

IXa Xa

Humano 1690	SFQKKTRHYF	IAAVERLWDY	GMSSSPHVL	NRAQSGSVPQ	FKKVVFQFT
Porco	SFQKRTRHYF	IAAVEQLWDY	GMSESPRALR	NRAQNGEVPR	FKKVVFREFA
Camundongo	SVQKTRHYF	IAAVERLWDY	GMSTS-HVLR	NRYQSDNVPQ	FKKVVFQFT.
	* *	*****	*****	*** *	** ** *

FIG. 1F

1740	DGSFTQPLYR	GELNEHLGGL	GPYIRAEVED	NIMVTFRNQA	SRPYSFYSSL
	DGSFTQPSYR	GELNKHLLGL	GPYIRAEVED	NIMVTFRNQA	SRPYSFYSSL
	DGSFSQPLYR	GELNEHLGGL	GPYIRAEVED	NIMVTFRNQA	SRPYSFYSSL
	***	** *	*****	*****	***

Ligação de fator IXa

1790	ISYEEDORQG	AEPRKNFVKP	NETKTYFWKV	QHMAPTKDE	FDCKAWAYFS
	ISYPDDQEQG	AEPRHNFVQP	NETRTYFWKV	QHMAPTEDE	FDCKAWAYFS
	ISYKEDQR-G	EEPRRNFVKP	NETKIYFWKV	QHMAPTEDE	FDCKAWAYFS
	***	** *	***	*****	*****

1840	DVDLEKDVHS	GLIGPLLICH	TNTLNPAHGR	QVTVQEFALF	FTIFDETKSW
	DVDLEKDVHS	GLIGPLLICH	ANTLNAAHGR	QVTVQEFALF	FTIFDETKSW
	DVDLERDMHS	GLIGPLLICH	ANTLNPAHGR	QVSVQEFALL	FTIFDETKSW
	*****	* **	*****	** *****	*****

1890	YFTENMERNC	RAPCNIQMED	PTFKENYRFH	AINGYIMDTL	PGLVMAQQQR
	YFTENVERNC	RAPCHLQMED	PTLKENYRFH	AINGYVMDTL	PGLVMAQNQR
	YFTEVVKRNC	KTPCNFQMED	PTLKENYRFH	AINGYVMDTL	PGLVMAQQQR
	*****	***	** *****	*****	*****

1940	IRWYLLSMGS	NENIHSIHFS	GHVFTVRKKE	EYKMALYNLY	PGVFETVEML
	IRWYLLSMGS	NENIHSIHFS	GHVFSVRKKE	EYKMAVYNLY	PGVFETVEML
	IRWYLLSMGN	NENIQSIHFS	GHVFTVRKKE	EYKMAVYNLY	PGVFETLEMI
	*****	*****	*****	*****	*****

Ligação

1990	PSKAGIWRVE	CLIGEHLQAG	MSTLFLVYSN
	PSKAGIWRVE	CLIGEHLQAG	MSTLFLVYSK
	PSRAGIWRVE	CLIGEHLQAG	MSTLFLVYSK
	**	*****	*****

Domínio CI

Humano	2020	KCQTPLGMAS	GHIRDFQITA	SGQYGQWAPK	LARLHYSGLI	NAWSTKEPFS
Porco		ECQAPLGMAS	GRIROFQITA	SGQYGQWAPK	LARLHYSGLI	NAWSTKDPHS
Camundongo		QCQIPLGMAS	GSIRDFQITA	SGHYGQWAPN	LARLHYSGLI	NAWSTKEPFS

FIG. 1G

2070	WIKVDLLAPM	IIHGKIQGA	RQKFSSLYIS	QFIIMYSLDG	KKWQTYRGNS
	WIKVDLLAPM	IIHGIMTQGA	RQKFSSLYIS	QFIIMYSLDG	RNWQSYRGNS
	WIKVDLLAPM	IVHGKIQGA	RQKFSSLYIS	QFIIMYSLDG	KKWLSYQGNS

2120	TGTLMVFFGN	VDSSGIKHNI	FNPPIIARYI	RLHPTHYSIR	STLRMELMGCOLN
	TGTLMVFFGN	VDASGIKHNI	FNPPIVARYI	RLHPTHYSIR	STLRMELMGCOLN
	TGTLMVFFGN	VDSSGIKHNS	FNPPIIARYI	RLHPTHSSIR	STLRMELMGCOLN

Domínio C2

Epitopo inibidor

Humano	2173	SCSMPLGMES	KAISDAQITA	SSYFTNMFAT	WSPSKARLHL	QGRSNAWRPQ
Porco		SCSMPLGMQN	KAISDSQITA	SSHLSNIFAT	WSPSQARLHL	QGRTNAWRPR
Camundongo		SCSIPLGMES	KVISDTQITA	SSYFTNMFAT	WSPSQARLHL	QGRTNAWRPQ

FIG. 1H

C2

2223	VNNPKEWLQV	DFQKTMKVTG	VTTQGVKSLL	TSMYVKEFLI	SSSQDGHQWT
	VSSAEWLQV	DLQKTVKVTG	ITQGVKSLL	SSMYVKEFLV	SSSQDGRRW
	VNDPKQWLQV	DLQKTMKVTG	IITQGVKSLL	TSMFVKEFLI	SSSQDGHHT

Fosfolipídeo

2273	LFFQNGKVKV	FQGNQDSFTP	VVNSLDPPLL	TRYLRHPOS	WVHQIALRME
	LFLQDGHKTV	FQGNQDSSTP	VVNALDPPLF	TRYLRHPTS	WAHQIALRLE
	QILYNGKVKV	FQGNQDSSTP	MMNSLDPPLL	TRYLRHPQI	WEHQIALRLE

Ligação

2323	VLGCEAODLY
	VLGCEAQDLY
	ILGCEAQDLY